

Der Einfluß von Harnstoff
auf die
Solvatation des Rinderserumalbumins

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

vorgelegt von
Franz Köbele
aus Sankt Blasien

3
1962

Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissen-
schaftlichen Fakultät der Universität
Frankfurt am Main

Dekan: Prof. Dr. Th. Wieland

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Stauff

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Staude

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 2. 1963

Tag der Promotion: 27. 2. 1963



INHALTSÜBERSICHT

EINLEITUNG	5
THEORIE	8
Lichtstreuung	8
Scheinbare und wahre Adsorption	11
Rotationsdispersion	15
EXPERIMENTELLER TEIL	17
Herstellen der Lösungen	17
Die Messungen der Brechungsindices	18
Die Messungen der Brechungsindex-Differenzen	18
Lichtstreuung	18
Apparatur	18
Küvetten	21
Messungen	22
Bezugsstandard	24
pH-Messungen	25
Die Messungen der optischen Drehung	25
AUSWERTUNG UND ERGEBNISSE	26
(Brechungsindices und -inkremente)	
Brechungsindex der Harnstofflösungen als Funktion des Harnstoffanteils	26
Änderung des Brechungsindex der Harnstoff- lösungen als Funktion des Harnstoffanteils	26
Brechungsindex-Differenz zwischen Protein- lösung und Lösungsmittelgemisch als Funktion der Proteinkonzentration	26
Auf $c_p = 0$ extrapolierte Brechungsinkremente der RSA-Lösung als Funktion des Harnstoff- anteils	26
(Lichtstreuung)	
Streuintensität des Lösungsmittelgemisches Harnstoff/Wasser als Funktion des Harnstoff- gehaltes	27

Streuwert-Differenz zwischen Proteinlösung und dessen "Lösungsmittel" als Funktion der Proteinkonzentration	29
Auf $c_0 = 0$ extrapolierte Lichtstreuungs- Inkremente der RSA-Lösungen als Funktion des Harnstoffgehaltes	29
Berechnung von χ_0 , $-\alpha$, x_{01}	29
Lichtstreuungsquotient χ_0	29
$-\alpha$ und x_{01}	30
$b(x_{02})$ und Δ_0	33
Rotationsdispersion	35
DISKUSSION DER ERGEBNISSE	38
ZUSAMMENFASSUNG	42
SCHRIFTTUM	43
ABBILDUNGEN	44
TABELLEN	56

(Die eingeklammerten Zahlen im Text verweisen auf die
Literaturzusammenstellung)

E I N L E I T U N G

Zu den interessantesten Reaktionen, zu denen die Proteine befähigt sind, gehören zweifellos die unter dem Begriff der Denaturierung zusammengefaßten. Das Interesse an diesen Erscheinungen und die deshalb schon früh einsetzenden Versuche einer Erklärung gingen Hand in Hand mit der Erkenntnis, daß eine Aufhellung der Vorgänge bei der Proteindenaturierung gleichzeitig auch tiefe Einblicke in Struktur und biochemische Eigenschaften der Proteine liefern würde — der Hauptgrund, weswegen diesem Problem unvermindert große Aufmerksamkeit geschenkt wird.

Besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang der Denaturierung durch die Einwirkung der verschiedensten Reagenzien zu, da von diesen wenige in ihrer Wirkung auf das Protein einander gleichen, vielmehr jedes in spezifischer Weise auf das Protein anspricht und somit gezielt eingesetzt werden kann.

Großes Interesse fand in diesem Rahmen eine Gruppe von Substanzen, die durch ihre Eigenschaft der Wasserstoffbrückenbildung ausgezeichnet sind. Zwei typische Vertreter sind Chloräthanol und Harnstoff, wobei die Einwirkung des ersteren eine Zunahme der Protein-Helix zur Folge hat, während der Harnstoff die Protein-Helix zerstört.

Dabei stellen sich fast zwangsläufig Fragen wie die folgenden: Was geschieht eigentlich, wenn man diesen Substanzen die Gelegenheit gibt, auf Proteine in wässriger Lösung denaturierend einzuwirken? Genügt etwa bereits ihre bloße Anwesenheit (etwa im Sinne eines Einflusses auf die DK der Lösung (1)) oder werden sie vom Protein chemisch gebunden? — um nur zwei Extremfälle zu nennen. Oder, falls sie lediglich adsorptiv festgehalten werden: Wie groß ist die so entstandene, das Protein umgebende Hülle, und in welchem Verhältnis sind die beiden Lösungsmittelkomponenten darin enthalten? (Des weiteren interessiert natürlich, wie sich diese Angaben mit der Lösungsmittelzusammensetzung ändern.) Welche Kräfte und Mechanismen sind bei der Anla-

gerung dieser Substanzen an das Protein wirksam? Und schließlich: Bei welcher Besetzung des Proteins mit der betreffenden Substanz beginnen Strukturänderungen am Protein?

Zur Lösung dieser Fragen kann die Anwendung folgender Methoden bzw. Theorien versucht werden: Die Bestimmung der "Bindung" der betreffenden Substanzen an das Protein geschieht gewissermaßen in zwei Stufen: Die Ermittlung der scheinbaren Bindung mit Hilfe der Lichtstreuungsmethode (2, 3, 4) und die Berechnung der wahren Bindung aus der scheinbaren mit Hilfe der Theorie der Adsorption aus flüssigen Mischungen (5). Dieselbe Theorie ermöglicht darüber hinaus auch die Berechnung der für die Bindung maßgeblichen Wechselwirkungskräfte.

Zur Ermittlung des Zusammenhanges zwischen eventuell adsorbierter Substanzmenge und Konformationsänderung kann die Rotationsdispersion (6, 7, 8, 9, 10, 14, 15) herangezogen werden.

Ein Teil dieser Fragen wurde bereits durch eine von J. Stauff und K.N. Mehrotra durchgeführte Arbeit (11) beantwortet bzw. einer Lösung zugänglich gemacht. Es wurde dort am Beispiel des Rinder-Serumalbumins (RSA) mit Hilfe der Lichtstreuung und der Theorie der Mischadsorption untersucht, wie die Zugabe von Chloräthanol zu einer Protein-Wasser-Lösung den Hydratationsgrad des Proteins beeinflusst.

Dabei ergab sich, daß bis zu einem Chloräthanol-Molenbruch (in der Mischung) von etwa 30 % nur Wasser, nach einem unvermittelten Umschlag hingegen oberhalb 60 % nur noch Chloräthanol gebunden wird.

Zusammen mit Angaben von Doty und Mitarbeitern (10) (bezüglich des Konzentrationsbereiches, in dem Chloräthanol eine Änderung der RSA-Struktur bewirkt) ermöglichen die von Stauff und Mehrotra (11) gefundenen Ergebnisse die Errechnung der Anzahl Moleküle Chloräthanol, die auf ein Proteinmolekül entfallen müssen, um eine Denaturierung auszulösen. Die entsprechende Relation beträgt etwa 180 Moleküle Chloräthanol pro Molekül RSA. Bei

einer Anzahl von 588 Aminosäuren je RSA-Molekül kommt somit auf je 3 bis 4 Aminosäuren ein Molekül Chloräthanol,

Im folgenden soll unter anderem versucht werden, die entsprechenden Zahlenverhältnisse im Falle des Harnstoffs festzustellen. Hinsichtlich der Auswertung der erzielten Versuchsergebnisse im Lichte der Theorie der Adsorption aus flüssigen Mischungen müßte der Harnstoff einen wesentlichen Vorteil gegenüber dem Chloräthanol bieten: Die Tatsache, daß Harnstoff einen Aktivitätskoeffizienten besitzt, der im beobachteten Bereich praktisch gleich 1 ist, sollte sich hier in einem idealen Adsorptionsverhalten äußern und bei der Auswertung mit Hilfe der Theorie der Mischadsorption zu besonders durchsichtigen Resultaten führen. Wieweit dies tatsächlich zutrifft, wird zu klären sein.

Abweichend von der erwähnten Arbeit (11), bei der zur Konstanthaltung der Proteinladung als vierte Komponente ein Puffersalz verwendet wurde, soll in der vorliegenden Arbeit wiederum am Beispiel des RSA untersucht werden, ob man auch dann zu vernünftigen Ergebnissen gelangt, wenn auf die Verwendung des Puffers verzichtet wird, was im Falle des Gelingens zu einer erheblichen Verminderung an experimentellem Aufwand und damit von Fehlerquellen führen müßte.

Das eigentliche Problem dieser Arbeit ist jedoch nicht in der Bestimmung der Proteinhydratation durch eine abgeänderte Methode zu suchen, sondern in der Ermittlung der Anlagerung von Harnstoff an das Protein sowie der zwischen beiden zu beobachtenden Wechselwirkungen.

Es ist zu klären, was unter Adsorption oder Anlagerung etwa des Harnstoffs an das Protein verstanden werden soll. Da eine direkte Bestimmung der gebundenen Menge nicht möglich ist, bleibt nur übrig, einen Raum in der unmittelbaren Umgebung des Proteins zu betrachten — etwa eine Solvathülle —, in dem die Änderung der Zusammensetzung des Lösungsmittels vor sich geht. Auf diesen sollen sich die im folgenden gemachten Aussagen beziehen.

THEORIE

Lichtstreuung

Die hier benutzte Methode wurde bereits von Ewart, Roe, Debye und McCartney (4) angewandt und beruht im wesentlichen auf der Auswertung von Lichtstreuungs- und Brechungsinkrement-Messungen an flüssigen Mehrkomponenten-Systemen.

Die theoretischen Grundlagen der Methode stammen von Zernicke (2) mit Modifikationen von Brinkman und Hermans (3), Edsall und Dandliker (12) sowie Doty und Edsall (13).

Hiernach ist die Trübungsdifferenz $\Delta\tau$ zwischen Lösung und zweikomponentigem Lösungsmittel

$$\Delta\tau = -A V \frac{D}{\lambda}.$$

Dabei bedeuten: $A = 32/3 \cdot \pi^3 \cdot kT/\lambda^4 \cdot n^2$

k = Boltzmann-Konstante

T = Absolute Temperatur

λ = Wellenlänge des verwendeten Lichtes

n = Brechungsindex der Lösung

V = Volumen der Mischung

$$A = \begin{vmatrix} G_{22} & G_{23} \\ G_{32} & G_{33} \end{vmatrix}$$

$$D = \begin{vmatrix} 0 & n_2 & n_3 \\ n_2 & G_{22} & G_{23} \\ n_3 & G_{32} & G_{33} \end{vmatrix},$$

wobei $n_j = \left(\frac{\partial n}{\partial m_j}\right)_V$

und $G_{ij} = \left(\frac{\partial^2 G}{\partial m_i \partial m_j}\right)_V.$

Die Indices bedeuten: 1 = Harnstoff, 2 = Wasser, 3 = RSA.

Nach Ausrechnen der Determinanten und unter Berücksichtigung, daß

$$G_{33} = \frac{\partial \mu_3}{\partial m_3} = RT \left(\frac{1}{m_3} + \frac{\partial \ln f_3}{\partial m_3} \right) \quad (f = \text{Aktivitätskoeffizient}),$$

$$m_j = c_j V/M_j \text{ und}$$

$$(H_3)_M = \frac{32}{3} \frac{\pi^3}{\lambda^4 N_L} n_M^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c_3} \right)_M^2 \quad (c_i = \text{Gewichtskonzentration} \\ M_i = \text{Molgewicht})$$

erhält man für das Dreikomponenten-System den Ausdruck

$$\frac{\Delta \tau}{c_3 H_3} = \frac{M_3 \left(1 - \frac{M_2 G_{23}}{M_3 G_{22}} \frac{\partial n / \partial c_2}{\partial n / \partial c_3} \right)^2}{1 + \frac{\partial \ln f_3}{\partial \ln c_3} - \frac{m_3 G_{23}^2}{RT G_{22}}} + \frac{M_2^2 RT \left(\frac{\partial n}{\partial c_2} \right)^2}{m_3 M_3 \left(\frac{\partial n}{\partial c_3} \right)^2} \cdot \left(\frac{1}{G_{22}} - \frac{1}{G_{22}^0} \right)$$

(G_{22}^0 ist der Wert des "Lösungsmittels" Harnstoff/Wasser).

Eine wesentliche Vereinfachung ergibt sich, wenn auf die Proteinkonzentration $c_3 = 0$ extrapoliert wird. Dann wird nämlich wegen

$$G_{22}^0 = \lim_{c_3 \rightarrow 0} G_{22}$$

$$\lim_{c_3 \rightarrow 0} \left(\frac{\Delta \tau}{c_3} \right) = \left(\frac{\Delta \tau}{c_3} \right)_{OM} = (H_3)_{OM} \cdot M_3 \left(1 - \frac{M_2 G_{23}}{M_3 G_{22}} \cdot \frac{\partial n / \partial c_2}{\partial n / \partial c_3} \right)^2.$$

Hierbei und im weiteren Verlauf bedeuten Index OM : $c_3 \rightarrow 0$, Mischung Harnstoff/Wasser und Index OW : $c_3 \rightarrow 0$, Wasser.

Berücksichtigt man nun, daß

$$(H_3)_{OM} = \frac{32}{3} \frac{\pi^3}{\lambda^4 N_L} n_{CM}^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c_3} \right)_{OM}^2 \quad \text{und daß}$$

$$\frac{M_2 G_{23}}{M_3 G_{22}} = \frac{M_2 \frac{\partial \mu_2}{\partial m_3}}{M_3 \frac{\partial \mu_2}{\partial m_2}} = - \frac{M_2}{M_3} \frac{\partial m_2}{\partial m_3} = - \frac{\partial c_2}{\partial c_3},$$

und führt man für den Differentialquotienten $\frac{\partial c_2}{\partial c_3}$ die Größe $-\alpha$ ein (= die Änderung der Gewichtskonzentration des Wassers bei Zugabe von 1 g/ml Protein — die "scheinbare" Solvation der Komponente 2 an die Komponente 3 —), so ergibt sich

$$\left(\frac{\Delta \tau}{c_3}\right)_{OM} = \frac{32}{3} \frac{\pi^3}{\lambda^4 N_L} n_{OM}^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c_3}\right)_{OM}^2 \cdot M_3 \left(1 - \alpha \left(\frac{\partial n / \partial c_2}{\partial n / \partial c_3}\right)_{OM}\right)^2.$$

Für die Lichtstreuung in einer einzigen Lösungsmittel-Komponente (hier: in Wasser) gilt

$$\left(\frac{\Delta \tau}{c_3}\right)_{OW} = \frac{32}{3} \frac{\pi^3}{\lambda^4 N_L} n_{OW}^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c_3}\right)_{OW}^2 \cdot M_3,$$

und die Kombination beider Gleichungen und Auflösung nach $-\alpha$ ergibt

$$-\alpha = \left[\frac{\left(\frac{\Delta \tau}{c_3}\right)_{OM}^{1/2}}{\left(\frac{\Delta \tau}{c_3}\right)_{OW}^{1/2}} \frac{n_{OW}}{n_{OM}} \frac{\left(\frac{\partial n}{\partial c_3}\right)_{OW}}{\left(\frac{\partial n}{\partial c_3}\right)_{OM}} - 1 \right] \frac{\left(\frac{\partial n}{\partial c_2}\right)_{OM}}{\left(\frac{\partial n}{\partial c_2}\right)_{OM}}.$$

Durch Definition eines Lichtstreuungsquotienten

$$\chi_o = \left[\frac{\left(\frac{\Delta \tau}{c_3}\right)_{OM}}{\left(\frac{\Delta \tau}{c_3}\right)_{OW}} \right]^{1/2}$$

und unter Berücksichtigung der Relation (φ = Dichte der Mischung)

$$\left(\frac{\partial n}{\partial c_2}\right)_{OM} = \frac{1}{\varphi} \left(\frac{\partial n}{\partial x_2}\right)_{OM} = -\frac{1}{\varphi} \left(\frac{\partial n}{\partial x_1}\right)_{OM}$$

gelangt man durch Umformung zu der Gleichung

$$-\alpha = -\varphi \left[\chi_o (n_{OW}/n_{OM}) \left(\frac{\partial n}{\partial c_3}\right)_{OW} - \left(\frac{\partial n}{\partial c_3}\right)_{OM} \right] \left[\frac{\partial n}{\partial x_1} \right]_{OM}^{-1},$$

die in dieser Form zur Berechnung von $-\alpha$ benutzt wurde.

Scheinbare und wahre Adsorption

Als Maß für das Adsorptionsvermögen eines Adsorptionsmittels gibt man im allgemeinen an, wieviel g Substanz von 1 g (bisher auch pro cm^2) des Adsorptionsmittels festgehalten werden.

Bei der hier betrachteten Untersuchung der Solvathülle — in der Definition, wie sie in der Einleitung gegeben wurde — geht es darum, deren Volumen und Zusammensetzung anzugeben sowie deren Änderung bei sich ändernder Zusammensetzung des Lösungsmittel-Gemisches.

Eine grundsätzliche Schwierigkeit beim Versuch, quantitative Angaben über die Mengenverhältnisse in der Solvathülle zu machen, ist in der Tatsache begründet, daß sich zwar die Zusammensetzung des Lösungsmittel-Gemisches vor und nach der Zugabe des Adsorptionsmittels bestimmen läßt — also vor und nach der Konzentrationsänderung infolge selektiver Adsorption — daß aber über die Verhältnisse in der Hülle Aussagen erst möglich sind, wenn von anderer Seite weitere Daten geliefert werden (z.B. durch Voraussetzen eines bestimmten Modells).

Es ist also wohl möglich, die Differenz zwischen der Ausgangskonzentration (von Substanz 2)

$$c_2 = \frac{w_2}{V}$$

und der Konzentration nach erfolgter Adsorption

$$c'_2 = \frac{w_2 - w_{s2}}{V - w_{s1} V_{s1} - w_{s2} V_{s2}} = \frac{w_2 - w_{s2}}{V - \frac{w_{s2}}{c'_2}}$$

(w_{s1} , w_{s2} = Gewicht der betreffenden Substanz in der Solvathülle; V_{s1} , V_{s2} = partielles spezifisches Volumen) festzustellen, die sogenannte "scheinbare Adsorption"

$$c_2 - c'_2 = \frac{w_2}{V} - \frac{w_2 - w_{s2}}{V - w_{s1} V_{s1} - w_{s2} V_{s2}} = \frac{w_2}{V} - \frac{w_2 - w_{s2}}{V - \frac{w_{s2}}{c'_2}} .$$

Das geschieht im vorliegenden Falle mit Hilfe der Lichtstreuung; man erkennt leicht die Identität der "scheinbaren Adsorption" mit $-\alpha$:

$$c_2 - c_2' = \frac{\partial c_2}{\partial c_3} = -\alpha.$$

Um aber w_{s1} und w_{s2} ermitteln zu können, ist eine weitere Gleichung erforderlich.

Führt man nun versuchsweise die Größe

$$\lambda = v_s'/v = \text{const.}$$

ein, so erhält man aus den vorangehenden Gleichungen

$$\begin{aligned} -\alpha &= \frac{w_2}{v} - \frac{w_2 - w_{s2}}{v - v_s'} \\ &= \frac{v \cdot w_{s2} - v_s' \cdot w_2}{v(v - v_s')} \\ &= \frac{\lambda}{1-\lambda} \left(\frac{w_{s2}}{v_s'} - \frac{w_2}{v} \right) \end{aligned}$$

und nach Division durch ϱ (= Dichte der Mischung) die Gleichung

$$-\alpha = \varrho \frac{\lambda}{1-\lambda} (x_{s2} - x_2),$$

in der x_{s2} den gesuchten Gewichtsbruch der Substanz 2 in der Solvathülle bedeutet:

$$x_{s2} = x_2 + \frac{-\alpha}{\varrho \cdot \frac{\lambda}{1-\lambda}}.$$

Unter der — durch das Experiment bestätigten — Annahme, daß λ bis zu verschwindenden Konzentrationen der Komponente 1 herab konstant ist, läßt sich der Wert der unbekannten Größe $\frac{\lambda}{1-\lambda}$ durch folgenden Kunstgriff ermitteln:

Die mit der vorletzten Gleichung identische Beziehung

$$-\alpha = \varrho \cdot \frac{\lambda}{1-\lambda} (x_{s2} - 1 + x_1)$$

wird nach x_1 differenziert:

$$\frac{d(-\alpha)}{d x_1} = g \cdot \frac{\lambda}{1-\lambda} \left(\frac{d x_{\sigma 2}}{d x_1} + 1 \right) ;$$

aus der Überlegung heraus, daß $x_{\sigma 2}$ bei verschwindender Harnstoffkonzentration gleich 1, also konstant wird, und g zu g_{20} , folgt:

$$\lim_{x_1 \rightarrow 0} \left(\frac{d x_{\sigma 2}}{d x_1} \right) = 0$$

und somit

$$\lim_{x_1 \rightarrow 0} \left(\frac{d(-\alpha)}{d x_1} \right) = g \cdot \frac{\lambda}{1-\lambda} .$$

Damit ist aber in der Bestimmungsgleichung für $x_{\sigma 2}$ die letzte Unbekannte durch eine leicht zu ermittelnde Größe ersetzt worden; man hat lediglich im $-\alpha$ vs. x_1 -Diagramm den Tangens der Kurve für $x_1 \rightarrow 0$ festzustellen und in die genannte Gleichung einzusetzen:

$$x_{\sigma 2} = x_2 + \frac{-\alpha}{\lim_{x_1 \rightarrow 0} \left(\frac{d(-\alpha)}{d x_1} \right)} .$$

Gleichzeitig ist

$$\lambda = v_s' / v$$

gegeben, das die Bedeutung des Volumens Wasser hat, das dem Lösungsmittel-Gemisch Harnstoff/Wasser von 1 g Protein (in unendlicher Verdünnung) entzogen wird.

Die auf den Harnstoff bezogene entsprechende Größe ist naturgemäß

$$x_{\sigma 1} = 1 - x_{\sigma 2} .$$

Die wahre Adsorption aus Flüssigkeitsmischungen kann nur im Falle idealer Mischungen durch die Langmuirsche Adsorptions-

isotherme

$$\Gamma_1 = \frac{\Gamma_0 x_1}{b + x_1}$$

beschrieben werden. Im realen Fall ist eine Annäherung an die Wirklichkeit möglich durch Einführen von Überschußfunktionen. Dabei genügt zu einer recht genauen Beschreibung des Mechanismus bereits die einfachste Erweiterung, nämlich der Übergang zum Typ der simplen Mischung, für den die Bedingung gilt, daß

$$\mu_{\alpha 1}^E = A_{\alpha} x_{\alpha 2}^2 \text{ und}$$

$$\mu_{\alpha 2}^E = A_{\alpha} (1 - x_{\alpha 2})^2 .$$

Man gelangt so zu einer modifizierten Langmuir-Gleichung

$$x_{\sigma 2} = \frac{x_{\alpha 2}}{(1 - x_{\alpha 2}) e^{\frac{\Delta\mu_{02} - \Delta\mu_{01} + A_{\alpha}(2x_{\alpha 2} - 1) - A_{\sigma}(2x_{\sigma 2} - 1)}{RT}} + x_{\alpha 2}} ,$$

in der b jetzt eine Funktion der Zusammensetzung ist:

$$b(x_{\alpha 2}) = \exp \left[\frac{\Delta\mu_{02} - \Delta\mu_{01} + A_{\alpha}(2x_{\alpha 2} - 1) - A_{\sigma}(2x_{\sigma 2} - 1)}{RT} \right] .$$

(Index α steht für Phaseninneres, σ für Solvathülle;

$\Delta\mu_{01} = \mu_{0\alpha 1} - \mu_{0\sigma 1}$). Das ist die mathematische Formulierung der Tatsache, daß im allgemeinsten Fall für die Vorgänge bei der Mischadsorption sowohl die Konkurrenz zwischen Lösungsmittel und Gelöstem um die Besetzung der Grenzfläche des Adsorptionsmittels bestimmend ist als auch die Wechselwirkungsenergie der Komponenten untereinander. Entsprechend den verschiedenen Werten, welche die Größen $\Delta\mu_{02}$, $\Delta\mu_{01}$, A_{α} , A_{σ} annehmen können, gelangt man zu verschiedenen charakteristischen Typen von Adsorptionsisothermen.

Durch Vergleich solcher unter Zuhilfenahme vorgegebener Daten zustandegewonnenen Kurven mit der zu untersuchenden läßt sich diese einem bestimmten Typ zuordnen. Dies ermöglicht Aussagen über die Wechselwirkungsenergien und somit auch darüber, welche der beiden Mischungskomponenten bevorzugt adsorbiert wird.

Rotationsdispersion

Auf den theoretischen Erwägungen von Moffitt (6) sowie von Fitts und Kirkwood (7) und den empirischen Beobachtungen von Yang und Doty (8) sowie von Linderström-Lang und Schellmann (9) basieren die heutigen Kenntnisse von den Beziehungen zwischen dem Denaturierungsgrad gelöster Proteine und der damit einhergehenden Änderung der optischen Drehung mit der Wellenlänge des verwendeten Lichtes, der Rotationsdispersion.

Doty und Blout (14) fanden 1954, daß bestimmte synthetische Polypeptide hinsichtlich der hier erörterten Eigenschaften als Protein-analoge Modellsubstanzen geeignet sind, da diese, je nach Lösungsmittel, als α -Helix oder als statistisches Knäuel vorliegen und beim Übergang von der einen Form in die andere ihre spezifische Drehung bezüglich Vorzeichen und Größe in ähnlicher Weise ändern wie Proteine bei der Denaturierung.

Die Messungen an diesen Substanzen führten schließlich zu einer halbempirischen Gleichung, welche die hier zu untersuchenden Verhältnisse an einer Reihe von Proteinen in folgender Form richtig wiedergab:

$$\left[\alpha \right]_x = 1,39 \left[(a_R + f a_H) \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + f b_0 \left(\frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} \right)^2 \right] .$$

Hierbei hat λ_0 den Wert 212 nm. Die Produkte $f a_H$ und $f b_0$ repräsentieren den Einfluß, den das Vorliegen von α -Helices auf die optische Drehung nimmt, wobei f den in Helixform vorliegenden Bruchteil angibt. Es stellen also ($f = 1$!) a_H und b_0 Werte dar, die einem Helixanteil von 100 % entsprechen; sie sind deshalb für die betrachtete Gruppe von Substanzen Konstanten und haben die Werte 650 und -630. Die Größe a_R hingegen nimmt für jede Substanz einen anderen (konstanten) Wert an. Sie ist allein ein Maß für die optische Drehung auf Grund der Anwesenheit asymmetrischer C-Atome; man erhält sie in dem Fall, wo $f = 0$ wird, also das Protein-

Molekül als statistisches Knäuel vorliegt, was in 8-molarer Harnstofflösung zutrifft.

Um nun eine Antwort auf die Frage zu erhalten, welcher Bruchteil als Helix vorliegt, also wie groß f ist, trägt man

$$\frac{\lambda^2 - \lambda_0^2}{\lambda_0^2} \cdot \frac{[\alpha]_1}{1.39} \text{ gegen } \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} \text{ auf und errechnet aus dem Ordina-}$$

natenabschnitt (der der Summe $a_R + f a_H$ entspricht) bzw. aus der Steigung (die gleich $f \cdot b_0$ ist) den Wert für f .

Ein anderes Auswertungsverfahren bedient sich der Größe

$$\lambda_0 = \left[\frac{\Delta[\alpha]_1 \cdot \lambda^2}{\Delta[\alpha]_1} \right]^{1/2}, \text{ die allgemein für native Proteine Werte}$$

von über 260 nm und für denaturierte von weniger als 230 nm annimmt. Man erhält sie, indem man $[\alpha]_1 \cdot \lambda^2$ gegen $[\alpha]_1$ aufträgt und aus dem Steigungskoeffizienten der resultierenden Geraden die Wurzel zieht.

Beide Verfahren wurden im folgenden dazu benutzt, um bei dem Schritt für Schritt sich vollziehenden Einbau wachsender Mengen Harnstoff in die Protein-Solvathülle (als Folge des Übergangs zu immer stärker konzentrierten Harnstofflösungen) Beginn und Verlauf von Konformationsänderungen erkennen zu können (Abb. 5, S. 36 und Abb. 6, S. 37). Um aber sicher zu sein, daß diese Änderungen nicht etwa auf Aciditäts-Verschiebungen zurückzuführen sind, wurde von den Lösungen auch der pH-Wert bestimmt (Abb. 16, S. 55).

EXPERIMENTELLER TEIL

Herstellen der Lösungen

Die Messlösungen wurden durch Auflösen von Rinder-Serumalbumin (RSA) in wässriger Harnstofflösung hergestellt.

Das Serumalbumin (Serumalbumin vom Rind, trocken, reinst) wurde von den Behring-Werken (Marburg/Lahn) bezogen und gehörte einer einzigen Charge an.

Der Harnstoff (Urea puriss. cryst.) stammte von der Firma E. Merck, Darmstadt.

Das verwendete Wasser wurde in einer Quarzapparatur dreimal destilliert.

Da einerseits — zwecks Extrapolation auf die RSA-Konzentration null und zur Erhöhung der Genauigkeit — bei je einer Harnstofflösung einer bestimmten Konzentration Messungen an v e r s c h i e d e n konzentrierten RSA-Lösungen vorgenommen wurden, andererseits aber der Einfluß der Harnstoffkonzentration auf die RSA-Hydratation untersucht werden sollte, wurden sowohl RSA-Konzentration als auch Harnstoffanteil stark variiert, und zwar RSA zwischen 0,05 und 0,3 %, Harnstoff zwischen den Gewichtsanteilen 0,01 und 0,36 (bzw. 0,40).

Es hat sich aus später noch zu erläuternden Gründen als zweckmäßig erwiesen, bei den Harnstofflösungen die Angaben in Gewichtsbrüchen zu machen statt in Konzentrationen oder Volumenbrüchen; d.h. es wurden sowohl der Harnstoff als auch das Wasser e i n g e w o g e n . Die Meßlösungen wurden dann so hergestellt, daß das RSA auf einer Halbmikrowaage eingewogen und in der Harnstofflösung aufgelöst wurde. Alle Lösungen und Lösungsmittel wurden bei maximal 4°C aufbewahrt.

Messungen

Bei der vorliegenden Arbeit entfiel der überwiegende Teil der durchgeführten Messungen auf die Ermittlung der Größen, die zur Berechnung von $-\alpha$ erforderlich sind. Dabei handelt es sich um Messungen von Brechungsindices und Brechungsindex-Differenzen und um Lichtstreuungsmessungen.

Sie wurden alle bei einer Temperatur von 20°C und mit Licht der Wellenlänge 436 nm ausgeführt.

Die Messungen der Brechungsindices

wurden mit einem Pulfrich-Refraktometer (Carl Zeiss, Jena) vorgenommen.

Als Lichtquelle diente eine Quecksilberlampe (Osram, HQE 40), deren Strahlen bis auf die verwendete Komponente von einem Interferenzfilter (436 nm; Hersteller: Schott & Gen., Mainz) zurückgehalten wurde.

Die Messungen der Brechungsindex-Differenzen

wurden ausgeführt mit einem Differential-Refraktometer nach Debye in der Modifikation von Brice und Halwer (16). Es wurde dieselbe Lichtquelle-Filter-Kombination verwendet wie im Zusammenhang mit dem Pulfrich-Refraktometer.

Lichtstreuung

Die verwendete Lichtstreuungsapparatur (Abb. 1) bestand aus einem lichtdichten Kasten, in dem in einer (horizontalen) Ebene Lichtquelle, Interferenzfilter (436 nm; Schott & Gen., Mainz), Glasküvette, Shutter und Photo-Multiplier untergebracht waren.

Das Streuvolumen des Lichtes hatte die Maße 1,5 x 4 x 3 mm.

Die Stromversorgung der Lichtquelle (wassergekühlte Quecksilberhochdrucklampe St 75, Quarzlampengesellschaft, Hanau) erfolgte über einen Gleichrichter (Brandt-Elektrik; Ausgangsseite:

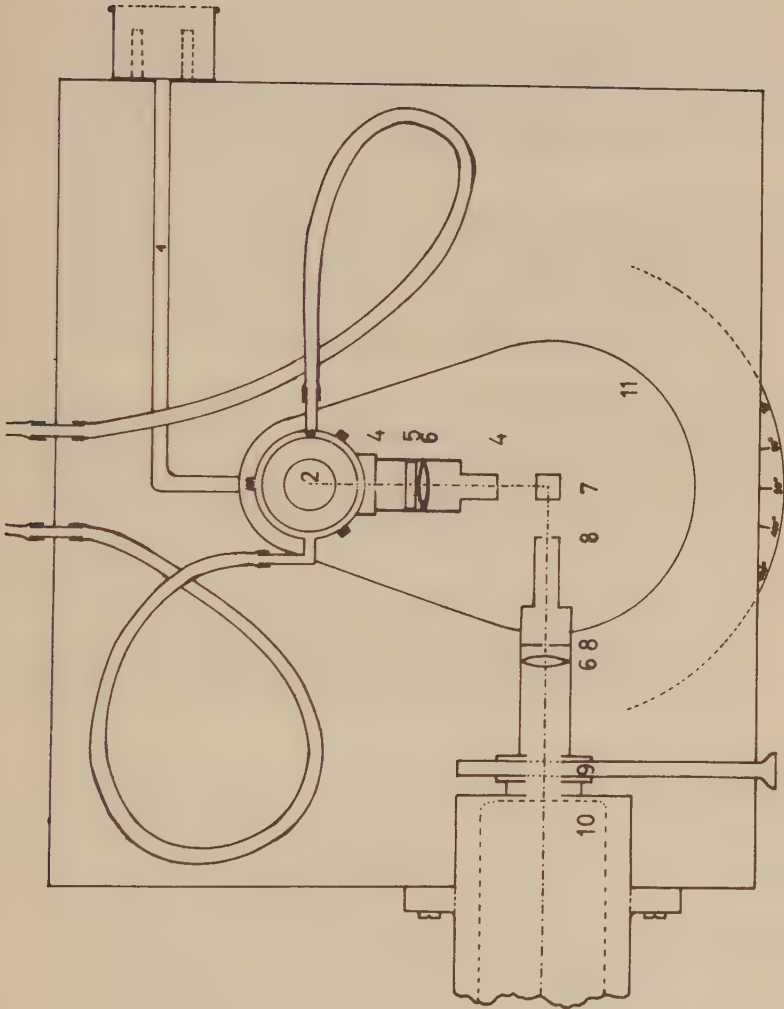


Abbildung 1. Lichtstreuungs-Apparatur
(Aufsicht in schematischer Darstellung)

Erläuterungen zu Abbildung 1

- 1 Strom-Zuleitung
- 2 Lichtquelle
- 3 Kühlwassermantel
- 4 Spaltblenden der Lichtquelle
- 5 Interferenzfilter
- 6 Linsen
- 7 Streu-Zelle
- 8 Spaltblenden des Lichtempfängers
- 9 Shutter
- 10 Photo-Multiplier
- 11 Drehtisch mit festmontierter Lichtquelle,
Streu-Zelle und Teilkreis-Scheibe

220 V, 1,5 A), der seinerseits an einen Spannungsstabilisator angeschlossen war.

Als Spannungsquelle für den Sekundärelektronen-Vervielfacher (SEV), Typ EMI 6094, diente ein Hochspannungsstabilisator, der jede beliebige Spannung zwischen 1000 und 1800 V zu liefern vermochte. Eine einmal eingestellte Spannung wurde auf $10^{-5} \%$ genau eingehalten.

Der (dem zu messenden Streuwert proportionale) Multiplizierstrom wurde von einem lichtelektrischen Kompensationsschreiber aufgezeichnet ("Micrograph BD2", Kipp & Zonen, Delft/Holland; verwendete Meßbereiche: 0-0,1; 0-0,25; 0-0,5; 0-1,0 A; 1 Skalenteil des empfindlichsten Bereiches = 10^{-9} A).

Die am SEV angelegte Spannung wurde während der gesamten Versuchsdauer bewußt konstant auf 1250 V gehalten und lediglich der Schreiber durch Wahl des geeigneten Empfindlichkeitsbereiches den verschiedenen Streulichtintensitäten angepaßt.

Küvetten

Statt Küvetten mit kreisrundem Querschnitt wurden — da zur Durchführung der vorliegenden Arbeit nur die 90° -Streuung gemessen zu werden brauchte — solche mit quadratischem Querschnitt benutzt.

Um von der Seite der Versuchsdurchführung her ein Höchstmaß an Reproduzierbarkeit zu erreichen, wurde wie folgt verfahren:

Die Trübungsmessungen sämtlicher Harnstoff- und RSA-Harnstoff-Lösungen wurden ohne Ausnahme mit ein und derselben Küvette vorgenommen.

Es wurde stets ein und dieselbe (besonders gekennzeichnete) Küvette der Lichtquelle zugewandt.

Nach jeder Neufüllung der Küvette wurden deren vier Außenwände mit einem Wildlederlappen so gereinigt, daß beim Betrachten gegen einen dunklen Hintergrund kein — durch Verdunsten des Wassers zurückgebliebener — Harnstoff- bzw. Proteinfilm oder Fingerabdruck mehr zu erkennen war

(was bei Nichtbeachtung zu Streuwertfehlern von größenordnungsmäßig 3 % führte).

Die Küvette wurde zu jeder Messung in einen fest mit dem Gerät verbundenen Halter gesteckt, der genau den gleichen Querschnitt hatte. Die Lage der Küvette relativ zur Apparatur war also streng reproduzierbar.

Die Lichtquelle, die auf einem (normalerweise drehbaren) Teilkreis befestigt ist, wurde durch Blockieren dieser Drehvorrichtung während der gesamten Versuchsdauer unverrückbar in ihrer 90° -Position festgehalten.

Es sei einschränkend bemerkt, daß das Fehlen der beiden letzten Punkte weder Reproduzierbarkeit noch Genauigkeit erheblich verschlechtert hätten, da ja die Intensität der Streustrahlung bei 90° ein Minimum durchläuft.

Hingegen hätte das Außerachtlassen der beiden erstgenannten Punkte — Verwendung mehrerer Küvetten oder Hinwendung einer anderen Küvettenseite zur Lichtquelle, also Drehung um 90° oder 180° — zu Diskrepanzen der Streuwerte in der Größenordnung von 5 % der Gesamtstreuung geführt. Da jedoch die Streuwert - D i f f e r e n z zwischen "Lösung" und "Lösungsmittel" — die naturgemäß stets kleiner ist als der Streuwert der Lösung — in die Rechnung eingeht, wäre in einem solchen Fall der resultierende Fehler noch (und bisweilen erheblich) größer gewesen.

Die Küvette wurde nach jeder Messung zweimal mit Wasser und zweimal mit Aceton gespült und bis zu dessen vollständiger Verdunstung in ein eigens hierfür angefertigtes Trockengestell gebracht.

Lichtstreuungsmessungen

Die RSA-Harnstoff-Lösungen und die entsprechenden Harnstofflösungen, deren Lichtstreuungsdifferenz gemessen werden sollte, mußten als erstes in hohem Maße staubfrei gemacht werden. (Das Streulicht eines Teilchens wächst mit der 6. Potenz seines Radius.) Hierzu wurden diese in einer wassergekühlten Phywe-

Laborzentrifuge ("Pirouette") 40 Minuten lang bei 15000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Von den zur Verfügung stehenden Zentrifugenbechern mit einem nutzbaren Volumen von 15 ml schieden nach kritischen Untersuchungen diejenigen aus Polyäthylen aus. Wurde nämlich (z.B.) eine bestimmte Menge einer Lösung auf zwei solcher Becher aufgeteilt, zentrifugiert und ihr Streuvermögen gemessen, so zeigte sich eine schlechtere Übereinstimmung der Streuwerte als bei Verwendung von Stahlbechern, die in der Folge denn auch ausschließlich benutzt wurden.

Zwecks Erzielung größerer Genauigkeit wurden von jeder Lösung drei Becher gefüllt und dementsprechend nach dem Zentrifugieren auch drei voneinander unabhängige Trübungsmessungen vorgenommen. Besonders wurde mit der bei Lichtstreuungsmessungen erforderlichen Behutsamkeit beim Transport der Lösung (Erschütterungs- und Staubfreiheit) und beim Umfüllen in die Küvette vorgegangen.

Dabei wurde zuerst ein gewisser Anteil des Becherinhalts verworfen, um die flottierenden Anteile zu beseitigen und gleich darauf — ohne abzusetzen — die folgende (mittlere) Portion in die Küvette gegossen. Der Rest, der den sedimentierten Bodensatz enthielt, wurde gleichfalls verworfen. Nach der sich anschließenden (oben beschriebenen) Reinigung ihrer Außenwände wurde die Küvette in ihren Halter in der Meßapparatur gesteckt.

Wurde die Küvette versehentlich einmal zu voll, so wurde das Überschüssige mit einer Serumspritze vorsichtig herausgesaugt. Es lag nahe, diese graduierte Spritze umgekehrt auch dazu zu verwenden, die Küvette stets auf Anrieb bis zu der gewünschten Stelle zu füllen. Diese Methode erwies sich indes als völlig untauglich: Solcherart eingefüllte Lösungen zeigten eine um ein Mehrfaches erhöhte Streuintensität — zweifellos infolge der darin befindlichen Glas- (bzw. bei Metallkolben: Metall-) Partikel, die durch die Reibung zwischen den beweglichen Teilen der Spritze entstanden waren.

Die eigentliche Messung bestand darin, daß bei im Strahlengang befindlicher Küvette der Shutter zurückgezogen wurde und der Schreiber daraufhin begann, den Multipliestrom zu registrieren. Je nach Konstanz des aufgezeichneten Stromes wurde die Messung nach $1/2$ bis 1 Minute durch Einschieben des Shutters beendet. War eine Konstanz durch störende Fremdpartikel in einem Falle nicht zu erhalten, so konnte die Messung insofern unberücksichtigt bleiben, als ja ohnehin von jeder Lösung drei voneinander unabhängige Portionen zur Messung gelangten und somit immer noch zwei Meßwerte (oder notfalls ein Meßwert) erhalten wurden.

Bezugstandard

Als Substanz, die einen über die gesamte Versuchsdauer konstanten Streuwert zu liefern vermochte, wurde vollständig wasserfreies Benzol verwendet, das so hergestellt wurde, daß Benzolum crystallisabile (Merck, Darmstadt) über Natrium destilliert und über Natrium aufbewahrt wurde.

Die Verwendung eines solchen Standards erwies sich als unerlässlich, denn die Schreiberausschläge zeigten während mehrerer Stunden nach dem Einschalten von Lichtquelle, Photo-Multiplier und Schreiber einen Trend zu immer kleineren Werten hin. Ein Rechnen mit derart zustande gekommenen Absolut-Streuwerten der Proteinlösungen hätte infolgedessen zu unsinnigen Ergebnissen geführt.

Es wurde deshalb stets nach je zwei bis drei an "Lösung" oder "Lösungsmittel" vorgenommenen Streuungsmessungen eine Messung der Benzol-Streuintensität eingeschaltet. Unter Zugrundelegung dieser Größe als Einheit wurden alle Meßergebnisse statt in Absolutwerten als Vielfache der Benzolstreuung angegeben. Da in die Formel zur Berechnung des Hydratationsgrades nur das Verhältnis von Streuintensitäten eingeht, konnten also direkt die auf Benzol bezogenen Größen benutzt werden, so daß sich eine Umrechnung in Absolutwerte erübrigte.

pH-Messungen

Parallel zu den bereits beschriebenen Messungen wurden die RSA-Harnstoff-Lösungen mit einer Glaselektrode (Typ: Ingold 402-S) und einem Knick-pH-Meter auf ihren pH-Wert untersucht (Abb. 16, S. 55).

Die Messungen der optischen Drehung

wurden mit einem "lichtelektrischen Präzisionspolarimeter 0,005⁰" (Carl Zeiss, Oberkochen) ausgeführt.

Hierzu wurden von den jeweils vier verschiedenen konzentrierten Proteinlösungen (die von jeder der verschiedenen konzentrierten Harnstofflösungen hergestellt worden waren) stets die an Protein reichste, d.h. 0,3 %ige, verwendet. (Noch bei dieser Konzentration wurde die Schwingungsebene des polarisierten Lichtes in ungünstigen Fällen nur um weniger als 0,2⁰ gedreht.)

Die benutzte Polarimeterröhre hatte die Standardlänge 1 dm, einen Durchmesser von 6 mm und ein Volumen von 3 ml. Es wurde Licht der folgenden Wellenlangen verwendet (in nm): 578, 546, 436, 405, 365.

AUSWERTUNG UND ERGEBNISSE

(Brechungsindices und -inkremente)

Der Brechungsindex der Harnstofflösungen als Funktion des Harnstoffanteils

$$n_M = f(x_1) \quad (\text{Abb. 7, S. 44})$$

wurde in Abb.7 dargestellt. (Man erkennt, daß zu größeren Harnstoffanteilen hin der Brechungsindex s t ä r k e r zunimmt.)

Die Änderung des Brechungsindex der Harnstofflösungen mit der Zunahme des Harnstoffanteils als Funktion des Harnstoffanteils

$$\frac{dn_M}{dx_1} = f(x_1) \quad (\text{Abb. 8})$$

Der Wert dieses Differentialquotienten für verschiedene x_1 wurde durch graphische Differentiation der Kurve $n_M = f(x_1)$ gewonnen. Es resultiert eine nach oben leicht konkav gekrümmte Kurve.

Die Brechungsindex-Differenz zwischen Proteinlösung und Lösungsmittelgemisch als Funktion der Proteinkonzentration

$$\Delta n = f(c_3) \quad (\text{Abb. 9})$$

Der Verlauf dieser Funktion ist für jede einzelne der verwendeten Harnstofflösungen (Harnstoff-Gewichtsbruch als Parameter) in Abb. 9 graphisch dargestellt.

Die Differentialquotienten dieser Kurven an den Stellen $c_3 = 0$, aufgetragen gegen x_1 , sind

die auf die Proteinkonzentration Null extrapolierten Brechungsinkremente der RSA-Lösung als Funktion des Harnstoffanteils

$$\left(\frac{\partial n}{\partial c_3}\right)_{OM} = f(x_1) \quad (\text{Abb. 10}).$$

(Lichtstreuung)

Im Gegensatz zur Bestimmung der Brechungsindex-Differenz zwischen einer Lösung und deren Lösungsmittel, die mittels einer

Differential-Meßmethode in einem einzigen Arbeitsgang durchgeführt wurde, mußten bei der Bestimmung der Lichtstreuungs-Differenz Lösungs- und Lösungsmittelwert getrennt gemessen werden.

Die Streuintensität des "Lösungsmittels" als Funktion dessen Harnstoffgehaltes

$$\tau_M = f(x_1) \quad (\text{Abb. 11})$$

Es war ursprünglich beabsichtigt, die zu subtrahierenden Lösungsmittel-Streuteile besonders genau dadurch zu bestimmen, daß die in einem $\tau_M = f(x_1)$ -Diagramm eingetragenen Meßpunkte durch eine Ausgleichskurve verbunden werden und dann die auf ihr liegenden τ_M -Werte als die wahren Lösungsmittel-Streuteile betrachtet und zur Subtraktion von den entsprechenden Proteinklösungs-Streuwerten verwendet werden sollten. Nach erfolgter Eintragung der genannten Meßpunkte mußte jedoch wegen ihrer starken Streuung daran gezweifelt werden, daß die erwähnte Kurve die gesuchten "wahren" Streuwerte mit der notwendigen Genauigkeit repräsentieren könnte.

Nachdem die so erhaltenen Werte trotz dieser Bedenken zur Berechnung von $\Delta\tau$ herangezogen worden waren, stellte sich heraus, daß letztere mit sich änderndem Harnstoffgehalt einen völlig unsteten und offensichtlich falschen Verlauf annahmen. Benutzte man statt dessen als Subtrahenden die den obengenannten, stark streuenden Meßpunkten zugrundeliegenden Streuwerte des "Lösungsmittels", dann lagen — gegen den Harnstoffgehalt von Lösung und "Lösungsmittel" aufgetragen — die $\Delta\tau$ -Werte gleicher Proteinkonzentration auf vernünftig erscheinenden, stetig sich ändernden Kurven. Aus diesem Grunde wurde ausschließlich die zuletzt geschilderte Praxis angewandt.

Das Versagen der ursprünglich vorgesehenen Methode hatte offensichtlich folgenden Grund:

Beim Herstellen jedes einzelnen der verschieden konzentrierten "Lösungsmittel" war eine andere — vom Harnstoff möglicherweise eingeschlossene, aber der eingewogenen Harnstoffmenge (ihrer

kleinen Zahl wegen aus statistischen Gründen) nicht unbedingt proportionale — Anzahl Partikeln mit in diese hineingelangt, die nun Anlaß zu unerwünschter, zusätzlicher Lichtstreuung gaben. Natürlich zeigten die von jedem dieser "Lösungsmittel" hergestellten Proteinlösungen die gleiche störende Streukomponente, die naturgemäß allein dadurch eliminiert werden konnte, daß nur solche "Lösungsmittel"-Lösungs-Paare miteinander verglichen wurden, die von der Herstellung her zusammengehörten.

(Ein anderer möglicher Weg wäre der gewesen, von Anfang an ein für alle Messungen ausreichendes — auch hinsichtlich der störenden Partikel zwangsläufig homogenes — "Lösungsmittel" herzustellen und aus diesem durch Aliquotieren alle niedriger konzentrierten.)

Überdies fehlte es nicht an Versuchen, die hier verantwortlich gemachten Partikeln zu entfernen. (Bezüglich solcher Reinigungsmethoden ist man natürlich bei Verwendung des festen "Lösungsmittel"-Bestandteiles Harnstoff im Nachteil gegenüber flüssigen Komponenten wie Chloräthanol und Glycerin, die sich verhältnismäßig leicht durch Destillation reinigen lassen.) Immerhin führten weder intensive Zentrifugierung noch Umkristallisieren noch Filtration durch G5-Fritten zum gewünschten Erfolg.

Die Ermittlung der Streuwerte der Proteinlösung bereitete nicht minder große Schwierigkeiten. Das Fehlen eines Puffers führte zu einer ähnlich schlechten Reproduzierbarkeit der Lichtstreuungs-Meßwerte, wie das etwa von Messungen an tridestilliertem Wasser her bekannt ist. Um dennoch zu verwertbaren Ergebnissen zu gelangen, blieb nur der mühsame Weg, die Mehrzahl der zu messenden Harnstoff-Wasser-Gemische und Proteinlösungen nicht nur einmal sondern — je nach der Güte der Reproduzierbarkeit — zwei- bis viermal voneinander unabhängig herzustellen und durch-

zumessen.

Die Differenz zwischen den Streuwerten von Proteinlösung und zugehörigem "Lösungsmittel" als Funktion der Proteinkonzentration

$$\Delta T = f(c_3)$$

wurde — wiederum für verschiedene Werte von x_1 als Parameter — in Abb. 12 graphisch dargestellt, und zwar getrennt für jede der separat angesetzten (aus Proteinlösung und "Lösungsmittel" bestehenden) Gruppe.

Die Bildung der Differenzialquotienten dieser Funktionen an den Stellen $c_3 = 0$ lieferte nach durchgeführter Mittelwertbildung die auf die Proteinkonzentration null extrapolierten Lichtstreuungs-Inkrementen der RSA-Lösungen als Funktion des jeweiligen Harnstoffgehaltes

$$\left(\frac{\Delta T}{c_3}\right)_{0M} = f(x_1),$$

die in Abb. 13 wiedergegeben sind. Die Radien der um die Punkte gezogenen Kreise entsprechen dem Fehler, mit dem die Inkremente behaftet sind. Dementsprechend wurden außer einer mittleren Kurve, die sich den Punkten am besten anschmiegt (und somit die größte Wahrscheinlichkeit für den wahren Verlauf der Funktion aufweist), zwei weitere Kurven eingezeichnet, jenseits derer die wahre Kurve sich mit Sicherheit nicht befindet.

Berechnung von χ_0 , $-\alpha$, x_{01}

Mit der geschilderten "Aufbereitung" der Meßwerte stehen nun die Daten zur Verfügung, die zur Berechnung von χ_0 und — zusammen mit diesem — von $-\alpha$ und x_{01} erforderlich sind.

Die Zahlenwerte sowohl der Ausgangsdaten als auch der resultierenden Zwischen- und Endergebnisse sind in der Tabelle 1 festgehalten.

Zur Berechnung des
Lichtstreuungsquotienten χ_0

(Abb. 14)

ist die Kenntnis der Lichtstreuungs-Inkrementen erforderlich.

Dies sind aber gerade die Daten, die sich nicht sehr genau bestimmen lassen, was ja auch dazu geführt hat, in Abb. 13 statt nur eine Kurve noch je eine "Minimal-" und eine "Maximal-Kurve" (gestrichelt) einzuzeichnen.

Von deren Vorhandensein wurde nun insofern Gebrauch gemacht, als die Größe χ_0 — und anschließend alle anderen auf ihr basierenden — in dreifacher Ausführung berechnet wurden:

- 1.) mit den Werten der mittleren, wahrscheinlichsten Kurve (m) und unabhängig davon
- 2.) mit denen der unteren (u) und
- 3.) mit denen der oberen Kurve (o).

Man erhielt also jeweils neben dem Mittelwert der berechneten Größen wieder zwei (einen unteren und einen oberen) Grenzwerte, außerhalb derer die gesuchte Größe mit Sicherheit nicht liegen wird, da man ja die Fehlergrenzen jener Größe in die Rechnung "eingearbeitet" hat, die — verglichen mit allen anderen Ausgangsdaten — am weitaus ungenauesten bekannt ist.

- α und x_{s1}

Die Größe $-\alpha$, die "scheinbare" Bindung von Wasser an das Protein, wurde nach der unter "Theorie" angegebenen Formel berechnet. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 1d wiedergegeben und außerdem in Abb. 2 in Abhängigkeit vom Harnstoff-Gewichtsbruch dargestellt.

Die mittlere Kurve, welche die wahrscheinlichsten Werte repräsentiert, nimmt von $x_1 = 0$ ausgehend schwach positive Werte an, durchläuft bei $x_1 = 0,04$ ein Maximum, geht bei etwa 0,08 durch $-\alpha = 0$ und fällt während des übrigen beobachteten Konzentrationsbereiches weiter zu stark negativen Werten.

Die vom Protein gebundenen "wahren" Harnstoffmengen wurden unter der Annahme eines im gesamten Mischungsbereich konstanten λ errechnet und in Abb. 3 dargestellt. Bei geringer Konzentration des Harnstoffs wird dieser vom Protein nur "zögernd" gebunden, oberhalb $x_1 = 0,04$ erfolgt jedoch eine verstärkte Harnstoffauf-

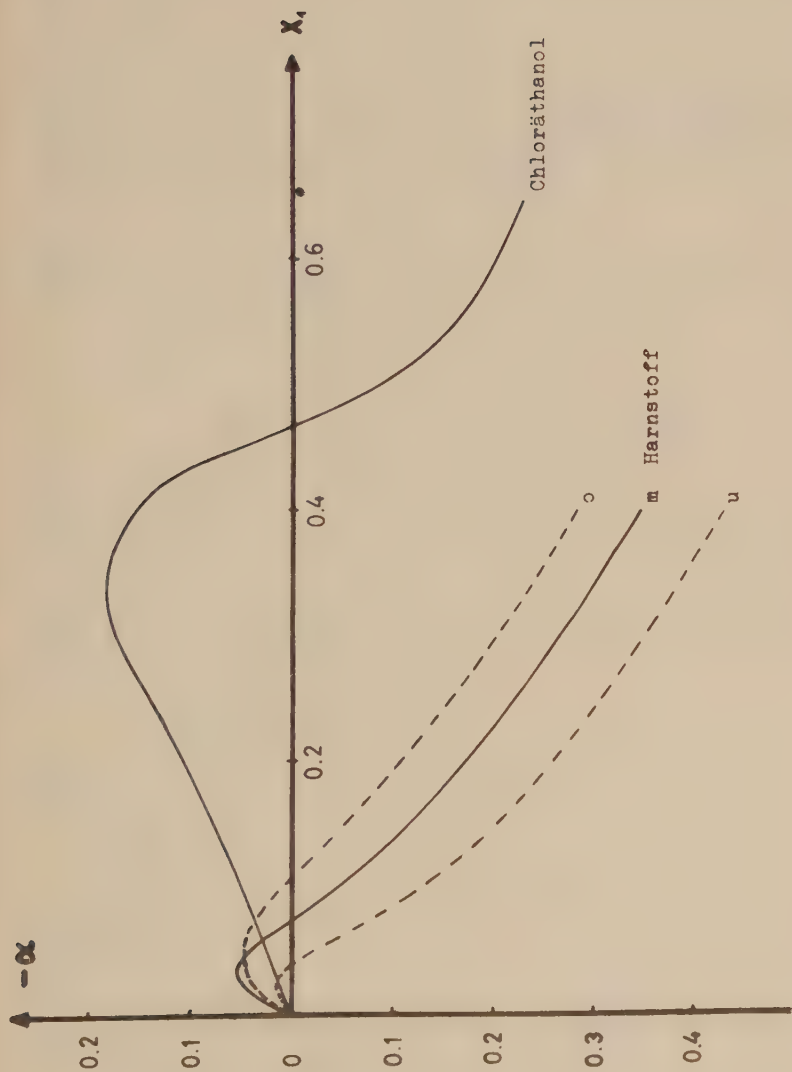


Abbildung 2

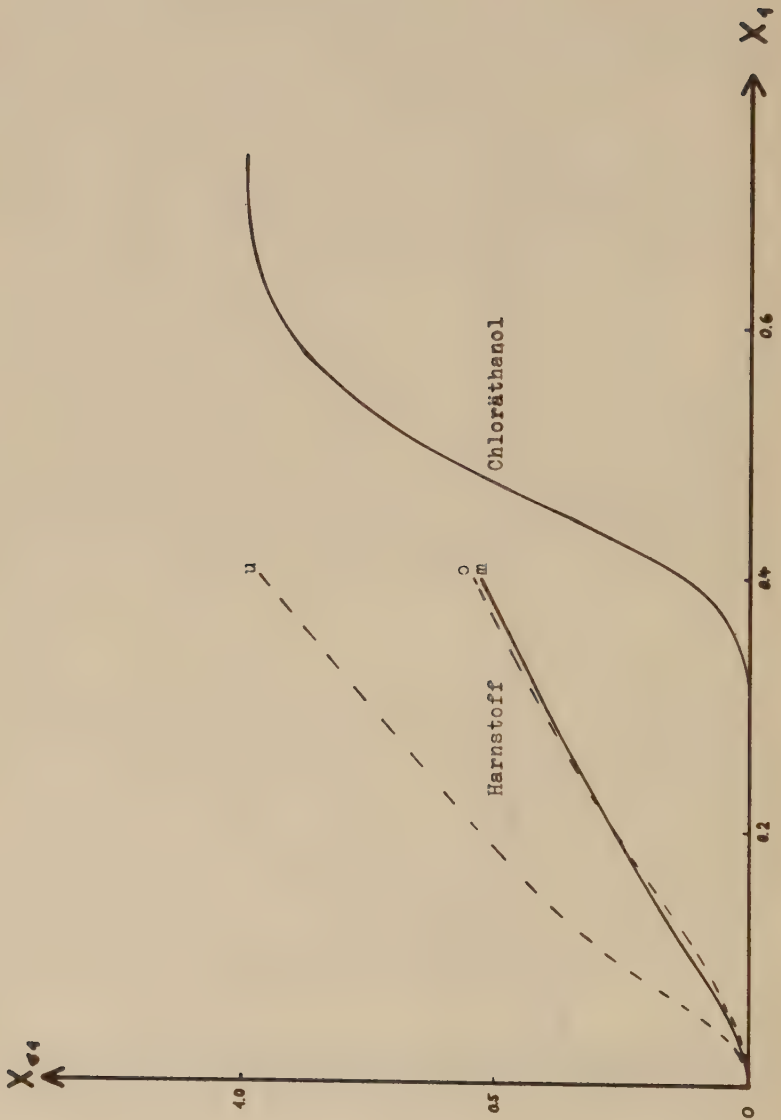


Abbildung 3

nahme, die bis zur Grenze des untersuchten Bereiches fast linear anwächst.

$b(x_{a2})$ und Δ_g

Mit den aus Tabelle 1e entnehmbaren Zahlenwerten für x_{a1} und der modifizierten Langmuir-Gleichung (s. unter "Scheinbare und wahre Adsorption") hat man eine Handhabe, um Näheres über den Wert der Größe $b(x_{a2})$ zu erfahren.

Eine Umformung der erwähnten Gleichung ergibt

$$x_{a2} \left(= \frac{\Gamma_{g2}}{\Gamma_{g20}} \right) = \frac{1}{\frac{1}{x_{a2}} \cdot b(x_{a2}) - b(x_{a2}) + 1} \text{ und}$$

$$\frac{1}{\Gamma_{g2}} = \left(\frac{1}{x_{a2}} \cdot b(x_{a2}) - b(x_{a2}) + 1 \right) \frac{1}{\Gamma_{g20}}$$

(Γ_{g2} ist die Anzahl g Wasser pro g Protein,

Γ_{g20} ist die von 1 g Protein maximal aufnehmbare Anzahl g Wasser
= Γ_{g2} bei $x_{a2} = 1$).

$\frac{1}{\Gamma_{g2}}$ wurde in Abbildung 4 gegen $\frac{1}{x_{a2}}$ aufgetragen. Der Differenzialquotient der resultierenden Geraden hat den Wert

$$\frac{d(1/\Gamma_{g2})}{d(1/x_{a2})} = \frac{b(x_{a2})}{\Gamma_{g20}} = 1,58 .$$

Mit $\Gamma_{g20} = 0,75$ folgt unmittelbar

$$b(x_{a2}) = 1,19 = \text{const.}$$

Zur Kontrolle wurde $b(x_{a2})$ auch noch aus dem Ordinatenabschnitt errechnet:

$$\left(\frac{1}{\Gamma_{g2}} \right) x_{a2} = 0 = (-b(x_{a2}) + 1) \cdot \frac{1}{\Gamma_{g20}} = -0,25 .$$

Auch hieraus folgt, daß

$$b(x_{a2}) = 1,19 = \text{const.}$$

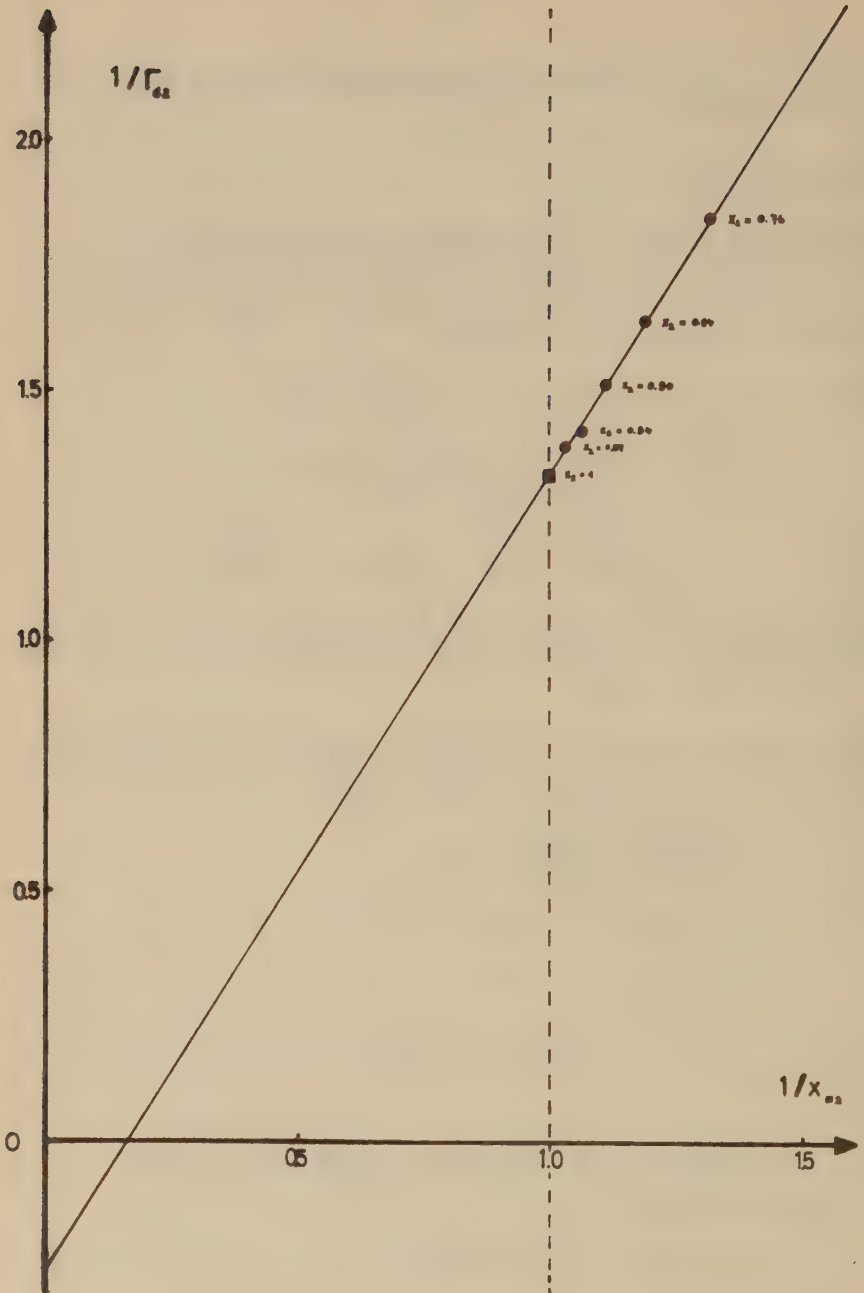


Abbildung 4

Wie man aus Abb. 4 erkennt, liegen alle eingetragenen Punkte (mit einer Ausnahme: $x_1 = 0,06$) auf der Geraden, die auf zwei voneinander unabhängigen Wegen zu dem Wert $b = 1,19$ führt (s. "Auswertung der Meßergebnisse"), womit erwiesen ist, daß diese Größe für das System Harnstoff-Wasser-RSA tatsächlich eine Konstante darstellt. Aus dieser Konstanz aber folgt, daß die Summe $A_{\alpha}(2x_{\alpha 2} - 1) - A_{\sigma}(2x_{\sigma 2} - 1)$ null sein muß und somit

$$x_{\sigma 2} = \frac{x_{\alpha 2}}{(1 - x_{\alpha 2}) e^{\Delta_{\sigma}/RT} + x_{\alpha 2}} \quad .$$

Der oben errechnete Wert für $b(x_{\alpha 2})$ kommt also dem Glied $e^{\Delta_{\sigma}/RT}$ zu.

Aus der Beziehung $e^{\Delta_{\sigma}/RT} = 1,19$ folgt unmittelbar

$$\Delta_{\sigma} = \ln 1,19 \cdot RT = 0,174 \cdot 1,99 \cdot 293 = 101 \text{ cal/Mol.}$$

Rotationsdispersion

Aus den Ergebnissen der "Messungen der optischen Drehung" (s. "Experimenteller Teil") wurde mit Hilfe der im theoretischen Teil erläuterten Methode die Rotationsdispersion von RSA bestimmt, das in Harnstoff-Wasser-Mischungen verschiedener Zusammensetzungen gelöst war.

Aus der graphischen Darstellung der gefundenen Resultate in Abb. 5 und 6 erkennt man, daß bis zu $x_1 = 0,13$ die ursprüngliche Konfiguration des RSA erhalten bleibt. Von da an aber verringert sich der Helixanteil von ungefähr 40 % ziemlich stetig, bis bei etwa $x_1 = 0,4$ völlige Denaturierung eingetreten ist und das Protein als statistisches Knäuel vorliegt.

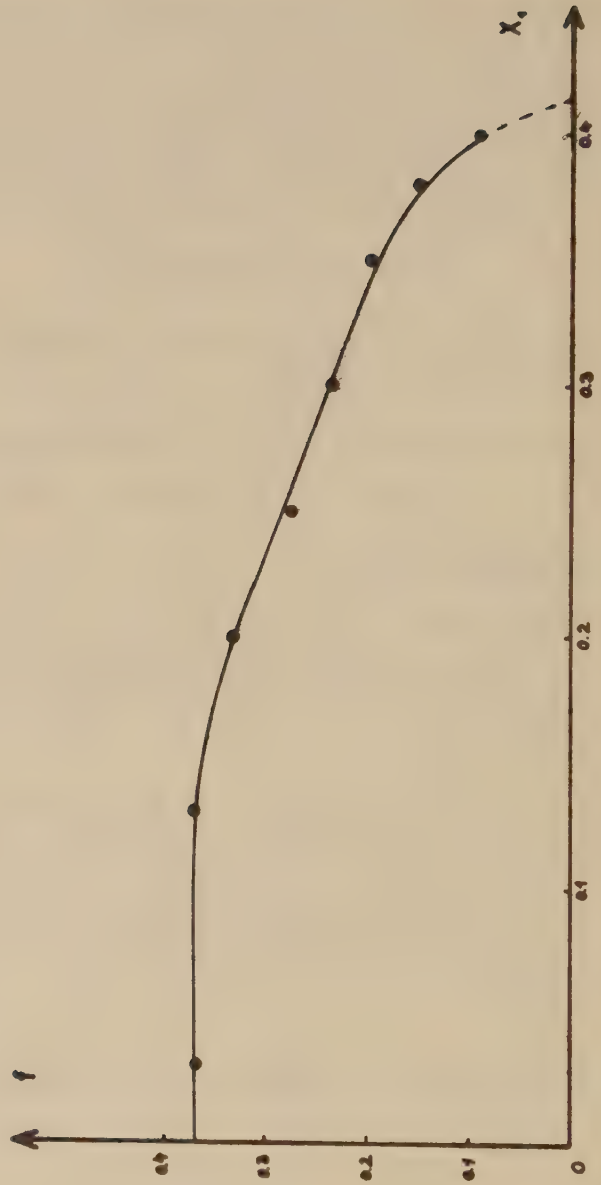


Abbildung 5



Abbildung 6

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Den $-\alpha$ -Werten für das System Harnstoff-Wasser-Protein wurden zum Vergleich die aus (11) entnommenen und von φ_1 in x_1 umgerechneten Chloräthanol-Werte in Abb. 2 (S. 31) gegenübergestellt.

Der dort sichtbare krasse Unterschied im Kurvenverlauf findet sich wieder in Abb. 3 (S. 32), wo die beiden $x_{\sigma 1}$ -Kurven einander gegenübergestellt sind — nachdem auch hier für Chloräthanol φ_1 in x_1 und $\varphi_{\sigma 2}$ in $x_{\sigma 1}$ umgerechnet wurden.

Vergleicht man die so dargestellten an das Protein gebundenen Substanzmengen, so läßt sich folgendes erkennen:

Während im Falle des Chloräthanol's dessen Anteil an der Ausgangsmischung mehr als 30 % betragen muß, bis es überhaupt erst anfängt in die Proteinhülle eingebaut zu werden, beginnt dieser Einbau beim Harnstoff praktisch sofort nach dessen Vorhandensein in der Umgebung des Proteins.

Auch der weitere Verlauf der Kurven ist grundverschieden: Während nämlich der Chloräthanol-Anteil in der Solvathülle von der genannten Konzentration an unverhältnismäßig stark zunimmt und schon bei 60 % Mischungsanteil alleiniger Bestandteil der Hülle ist, wächst der Harnstoffgehalt der Solvathülle von Anfang an langsam und stetig. Da die Löslichkeitsgrenze des Harnstoffs bei etwa $x_1 = 0,40$ liegt, ist es naturgemäß nicht möglich, auch etwas über den jenseits dieser Grenze liegenden Konzentrationsbereich zu erfahren.

Eine Aussage darüber, welche der zwei Komponenten, Harnstoff oder Wasser, bevorzugt adsorbiert wird, läßt sich aus der Größe $b(x_{\alpha 2})$ gewinnen (s. "Scheinbare und wahre Adsorption).

Wie bereits unter "Ergebnisse" berichtet, zeigt die Auswertung der in Abb. 4 (S. 34) wiedergegebenen Daten, daß sich die modifizierte Langmuir-Gleichung

zu
$$x_{s2} = \frac{x_{a2}}{(1 - x_{a2}) e^{\Delta_s/RT} + x_{a2}} \quad \text{vereinfacht.}$$

Das bestätigt die eingangs geäußerte Erwartung, daß die Verwendung von Harnstoff, dessen Aktivitätskoeffizient im untersuchten Bereich fast genau gleich 1 ist, zu relativ leicht durchschaubaren Ergebnissen führen müßte: Die Bindung an das Protein gehorcht praktisch der idealen Gesetzmäßigkeit.

$e^{\Delta_s/RT}$ ist somit identisch mit b , für das (s. Ergebnisse) ein Wert gefunden wurde, der größer als 1 ist. Das heißt aber, daß

$$\Delta_s \left[\equiv \Delta\mu_{02} - \Delta\mu_{01} \equiv (\mu_{0a2} - \mu_{0s2}) - (\mu_{0a1} - \mu_{0s1}) \right] > 0.$$

Es ist also — in Worten — die Differenz zwischen dem Unterschied der freien Enthalpie des Wassers im freien und in dem am Protein gebundenen Zustand und dem Unterschied der freien Enthalpie des Harnstoffs im freien und in dem am Protein gebundenen Zustand größer als null. Das aber bedeutet, daß Wasser in der Bindung dem Harnstoff vorgezogen wird (vgl. (5), S. 334).

Obwohl die beiden verglichenen Substanzen sich unter den bisher geschilderten Aspekten recht ungleich verhalten, gibt es zwischen ihnen doch eine interessante Gemeinsamkeit: Errechnet man nämlich, wieviele Moleküle denaturierender Agenzien auf ein Molekül RSA entfallen müssen, damit eine Veränderung der Proteinstruktur beginnt, so findet man im Falle des Chloräthanolis die bereits in der Einleitung genannte Anzahl von etwa 180 Molekülen pro Molekül RSA und beim Harnstoff 150 bis 170 Moleküle pro Molekül RSA. Die Vermutung liegt nahe, daß dieser weitgehenden zahlenmäßigen Übereinstimmung eine entsprechende Übereinstimmung bei den Vorgängen zugrunde liegt, welche die Strukturänderung auslösen.

Das molekulare Geschehen stellt sich also etwa folgendermaßen dar: Bei zunehmender Konzentration der betreffenden Fremdmole-

küle in der Protein-Umgebung erhöht sich deren Konzentration auch in der "Hülle" des Proteins, indem sie die ursprünglich dort allein befindlichen Moleküle hinausdrängen, wobei die Frage offen bleibt, welches der zweierlei Hydratwasser (17; vgl. auch 18 und 19) ersetzt wird: Jenes in den Kettenhohlräumen oder das fester (etwa an ionisierbaren und polaren Gruppen der Aminosäure-Seitenketten) haftende. Ungeachtet dieses Austausches bleibt aber der ursprüngliche Helixanteil so lange erhalten, die Wasserstoffbrücken-Bindung also unversehrt, bis etwa 150 - 180 dieser Moleküle auf ein RSA-Molekül oder umgerechnet eines dieser Moleküle auf 3 - 4 Aminosäure-Moleküle kommen — unabhängig davon, um welches der hier behandelten Reagensien es sich gerade handelt! Dieses gleichsam stöchiometrische Verhältnis steht im Einklang mit der Feststellung von Kauzmann und Simpson (20), welche die Wirksamkeit des Harnstoffs eher in einer "Komplexbildung" mit dem Protein begründet sehen, als etwa in dem weniger gezielten, nicht stöchiometrischen Zusammenwirken der Moleküle mit dem elektrischen Feld des Proteins (vgl. auch (1)).

Erst mit dem Erreichen der genannten Besetzungsdichte ist im Falle des Harnstoffs offenbar der Energiebetrag von etwa 4 bis 6 kcal/Mol verfügbar, der zur Überwindung der Wasserstoffbrücken-Bindung erforderlich ist. (Andere Autoren (21) sprechen von 1,5 kcal.). Nachdem sich so gewissermaßen die erste Schlinge einer Helix losreißen konnte, erscheint es plausibel, daß diese zufolge ihrer Brown'schen Bewegung andere mit sich reißt und so das Geschehen in Gang bringt — um ein von Kauzmann (17, 22) stammendes Bild wiederzugeben. Entsprechendes ist auch im Falle der Auflösung der Tertiär-Struktur denkbar.

Die abschließend gestellte Frage nach der Durchführbarkeit der vorgesehenen Methode kann grundsätzlich bejaht werden. Das Weglassen des Puffers jedoch, das in der Hoffnung geschah, sich als wesentliche Vereinfachung zu erweisen, stellte sich als große Erschwerung heraus. Die somit unterbliebene Konstanthaltung der Proteinladung zeigte sich in einer ausgesprochen schlechten Reproduzierbarkeit, vor allem der Lichtstreuungs-Werte.

In gleicher Weise äußert sich ein Umstand, der nicht in der Methode sondern in der Wahl der verwendeten Substanz begründet ist: Es gelang nicht, die letzten, von Harnstoff mitgerissenen Partikeln zu entfernen, wie sich dies etwa bei flüssigen Mischungspartnern durch Destillation relativ einfach und sicher durchführen läßt.

Um trotz dieser Nachteile — durch Mittelwertbildung aus einer größeren Anzahl von Einzelmessungen — zu einigermaßen verlässlichen Werten zu gelangen, war streckenweise ein Mehrfaches des sonst erforderlichen Arbeits- und Zeitaufwandes vonnöten, da nicht nur ein und dieselbe Lösung mehrmals durchgemessen werden mußte, sondern die einzelnen Meßlösungen bis zu viermal neu herzustellen waren.

Dennoch konnte der mittlere Fehler bei der Lichtstreuung als dem ungenauesten "Schritt" nicht unter einen Wert von etwa 7 % gedrückt werden. Dementsprechend ist auch das Gesamtergebnis in x_{s1} mit diesem Fehler belastet.

ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren einmal Untersuchungen, die zu Aussagen über die Zusammensetzung der Solvathülle von Rinder-Serumalbumin führen sollten, das in einem Wasser-Harnstoff-Gemisch gelöst war, sowie über die Änderung dieser Zusammensetzung bei zunehmendem Harnstoffanteil in dem Gemisch.

Die verwendete Methode bediente sich der Theorie der Lichtstreuung in Mehrkomponenten-Systemen und bestand aus Messungen von Streulichtintensitäten, Brechungsindices und Brechungsinkrementen. Dabei wurde ein neuer und hinsichtlich seiner Gangbarkeit durchaus ungewisser Weg eingeschlagen, indem nämlich auf die Verwendung eines Puffers — wie er üblicherweise zur Konstanthaltung der Proteinladung benutzt wird — verzichtet wurde.

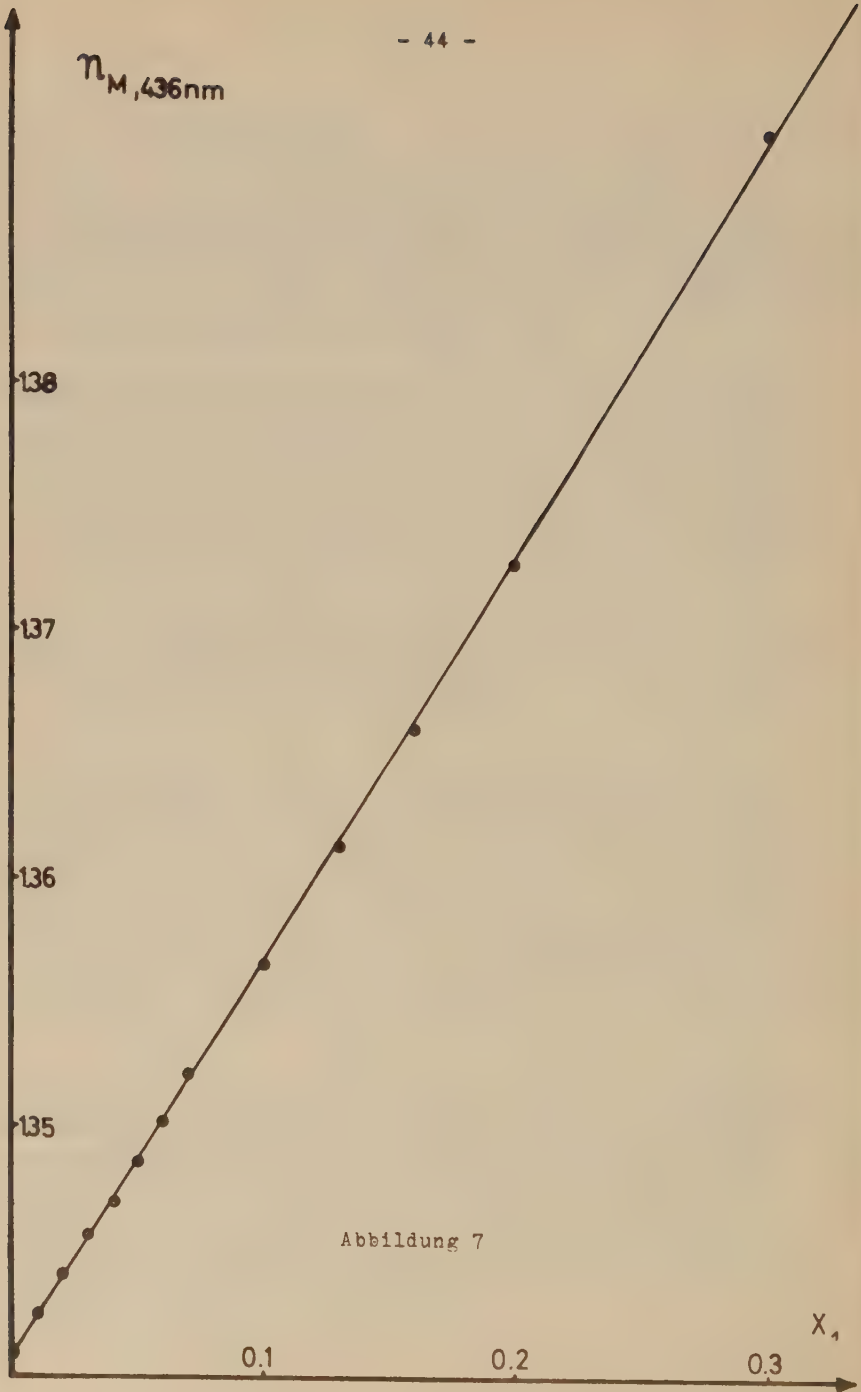
Aus den so erhaltenen Versuchsergebnissen, den "scheinbar" in die Proteinhülle aufgenommenen Mengen, wurden die "wahren" mit Hilfe der Theorie der Mischadsorption berechnet.

Da mit dem Harnstoff eine Substanz mit einem Aktivitätskoeffizienten von praktisch gleich 1 verwendet wurde, erlaubte diese Theorie darüber hinaus die Errechnung des Unterschiedes zwischen der Differenz der freien Enthalpie des Wassers im freien und an Protein gebundenen Zustand und der Differenz der freien Enthalpie des Harnstoffs im freien und an Protein gebundenen Zustand; d.h. des Energiebetrages, der dafür verantwortlich ist, daß das Wasser in der Bindung an das Protein bevorzugt wird, wie sich dabei herausstellte.

Schließlich wurde parallel mit der Anreicherung von Harnstoff in der Solvathülle des Proteins die Rotationsdispersion bestimmt und dadurch festgestellt, daß eine Änderung der Konfiguration des Serumalbumins eintritt, sobald etwa 160 bis 180 Moleküle Harnstoff auf ein Albuminmolekül entfallen; eine Zahl, die sich nach Auswertung der Versuchsergebnisse anderer Autoren bemerkenswerterweise auch für ein weiteres denaturierendes Reagens als gültig erwies, nämlich das Chloräthanol.

S C H R I F T T U M

- (1) Steinhardt, J., J. Biol. Chem. 122, 371 (1938)
- (2) Zernicke, F., Diss. (Amsterdam 1915); Arch. neerland. (3A) 4, 74 (1918)
- (3) Brinkman, H.C. und J.J. Hermans, J. Chem. Phys., 17, 574 (1949)
- (4) Ewart, R.H., C.P. Roe, P. Debye und J.R. McCartney, J. Chem. Phys. 14, 687 (1946)
- (5) Stauff, J., Kolloidchemie, S. 332 ff. (Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960)
- (6) Moffitt, W., J. Chem. Phys., 25, 467 (1956)
- (7) Fitts, D. und J.G. Kirkwood, J. Am. Chem. Soc. 78, 2650 (1956)
- (8) Yang, J.T. und P. Doty, J. Am. Chem. Soc. 79, 761 (1957)
- (9) Linderström-Lang und J.A. Schellman, Bioch. Biophys. Acta 15, 156 (1954)
- (10) Doty, P. Proc. 4th Internat. Congr. Bioch. (Wien 1958) Vol. VIII (Proteins) S. 18 ff. (Pergamon Press)
- (11) Stauff, J. und K.N. Mehrotra, Kolloid-Z. 176, 1 (1961)
- (12) Edsall, J.T. und W.B. Dandliker: Fortschr. chem. Forsch. 2, 1 (1951)
- (13) Doty, P. und J.T. Edsall, Adv. Prot. Chem. 6, 35 (1951)
- (14) Doty, P. und E.R. Blout, Proc. 4th Intern. Congr. Bioch. (1958) Vol. VIII (London 1960)
- (15) Djerassi, C., Optical Rotatory Dispersion (New York 1960)
- (16) Brice, B.A. und M. Halwer, J. opt. Soc. Amer. 41, 1033 (1951)
- (17) Kauzmann, W., Advances in Protein Chemistry, Vol. XIV, S. 1 (New York 1959)
- (18) Pauling, L., J. Am. Chem. Soc. 67, 555 (1945)
- (19) Mellon, E.F., A.H. Korn und S.R. Hoover, J. Am. Chem. Soc. 62, 827 (1947), 73, 1870 (1951)
- (20) Kauzmann, W. und Simpson, J. Am. Chem. Soc. 75, 5139 (1953)
- (21) Schellman, J.A., C.r. trav. lab. Carlsberg, Ser. chim. 29, No. 14 (1957)
- (22) Kauzmann, W., The Mechanism of Enzyme Action (Baltimore, 1954); entnommen aus (5)



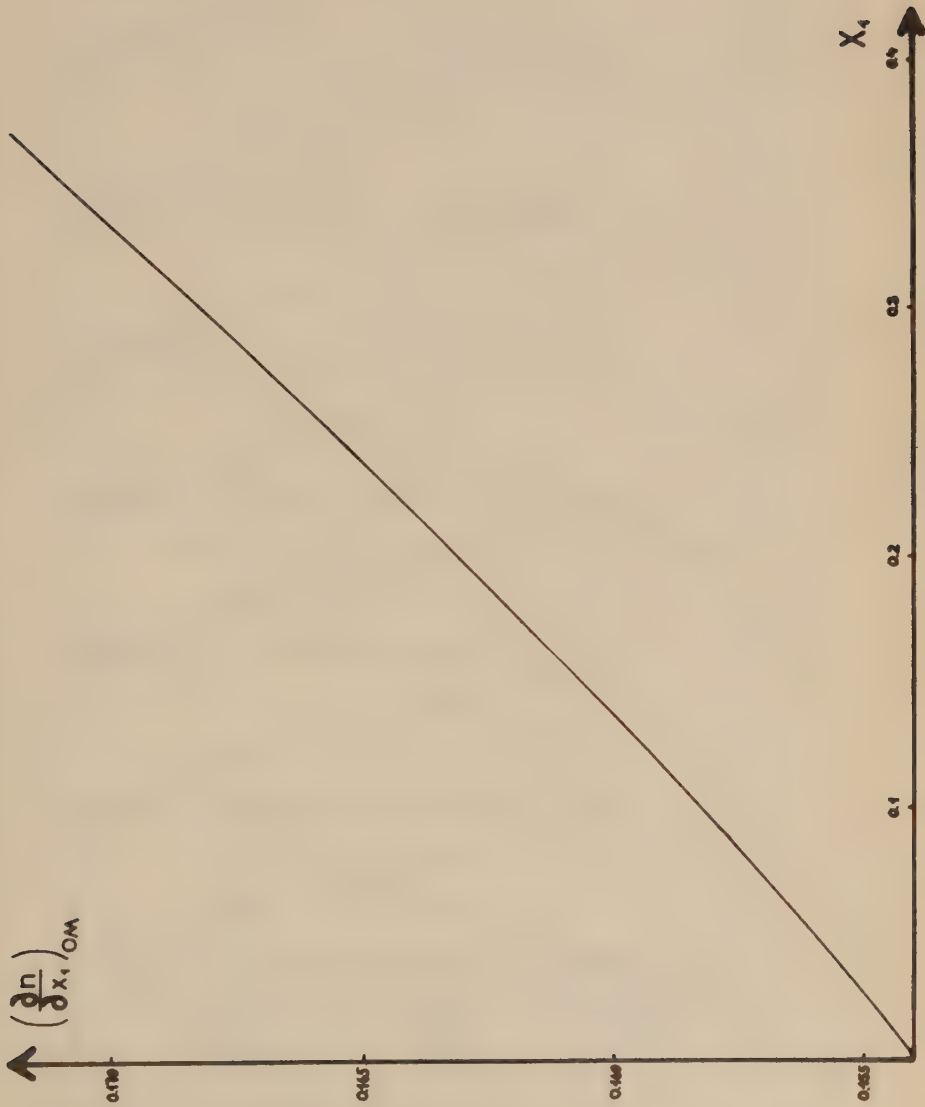


Abbildung 8

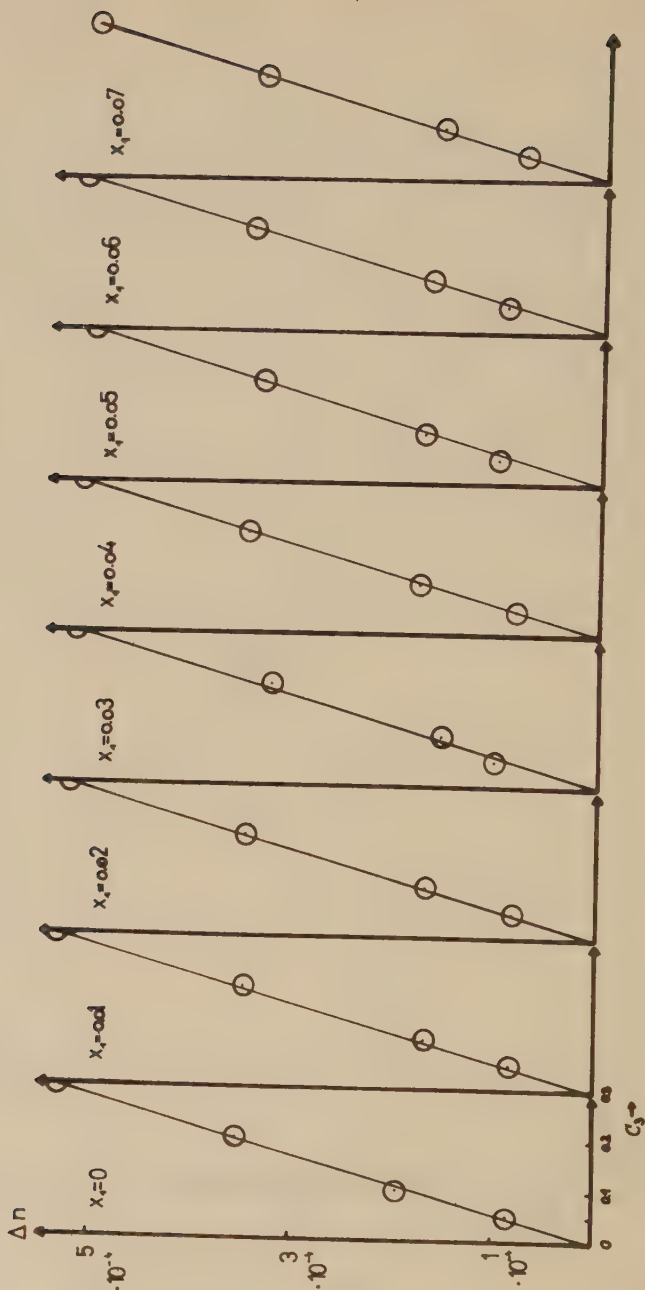


Abbildung 9a

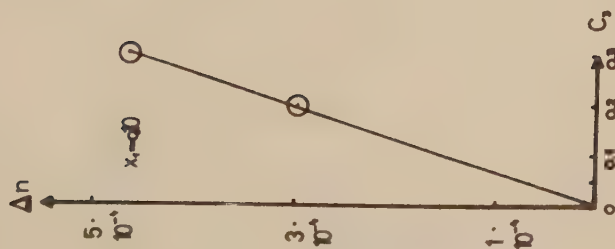
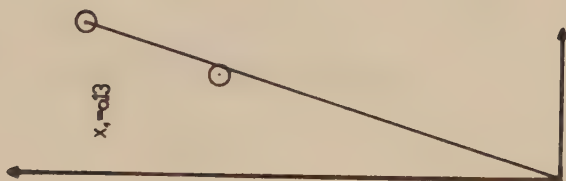
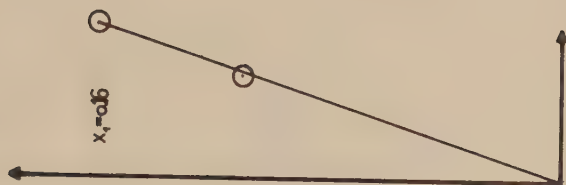


Abbildung 9b

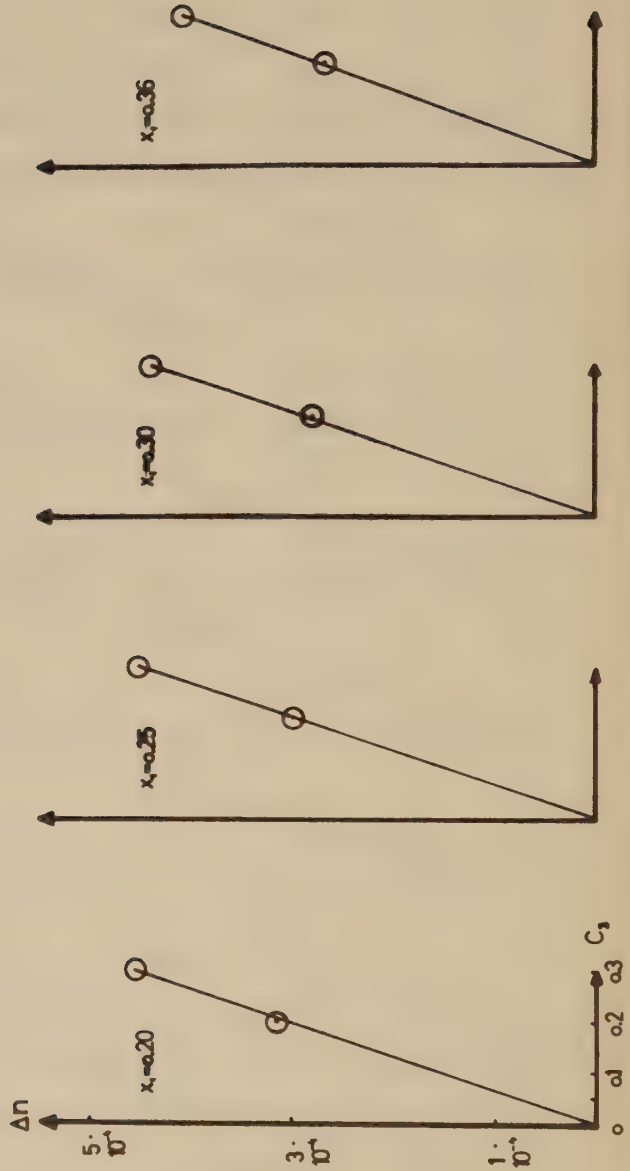


Abbildung 9c

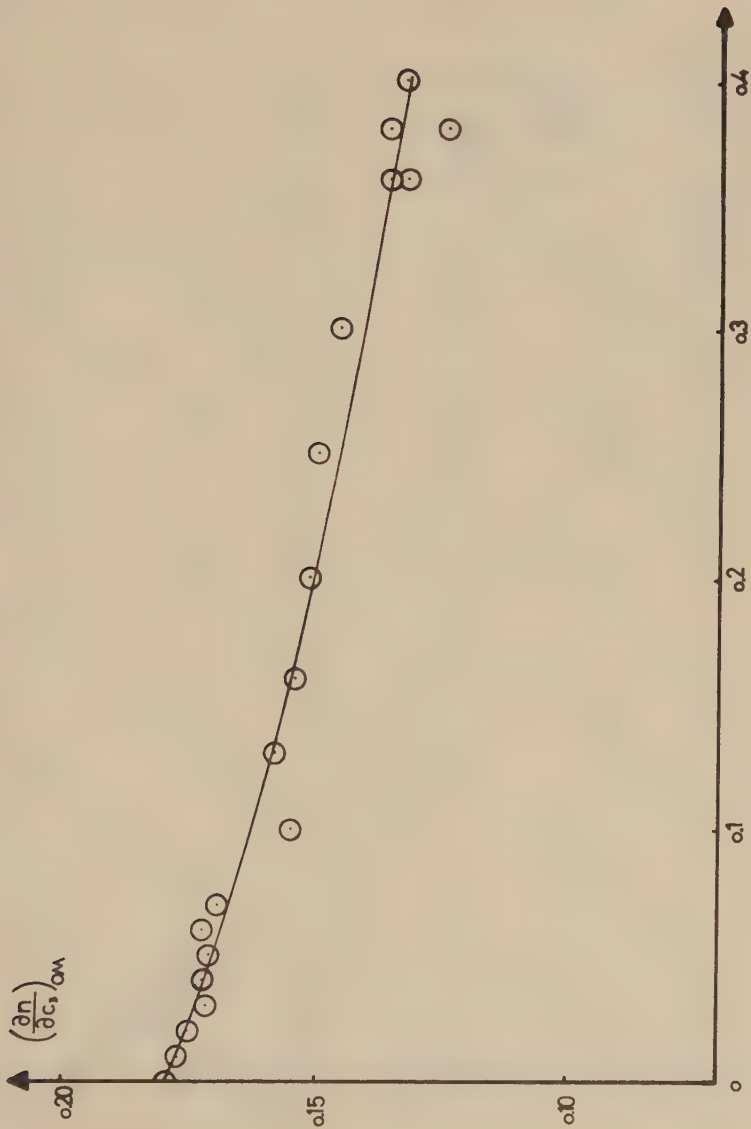


Abbildung 10

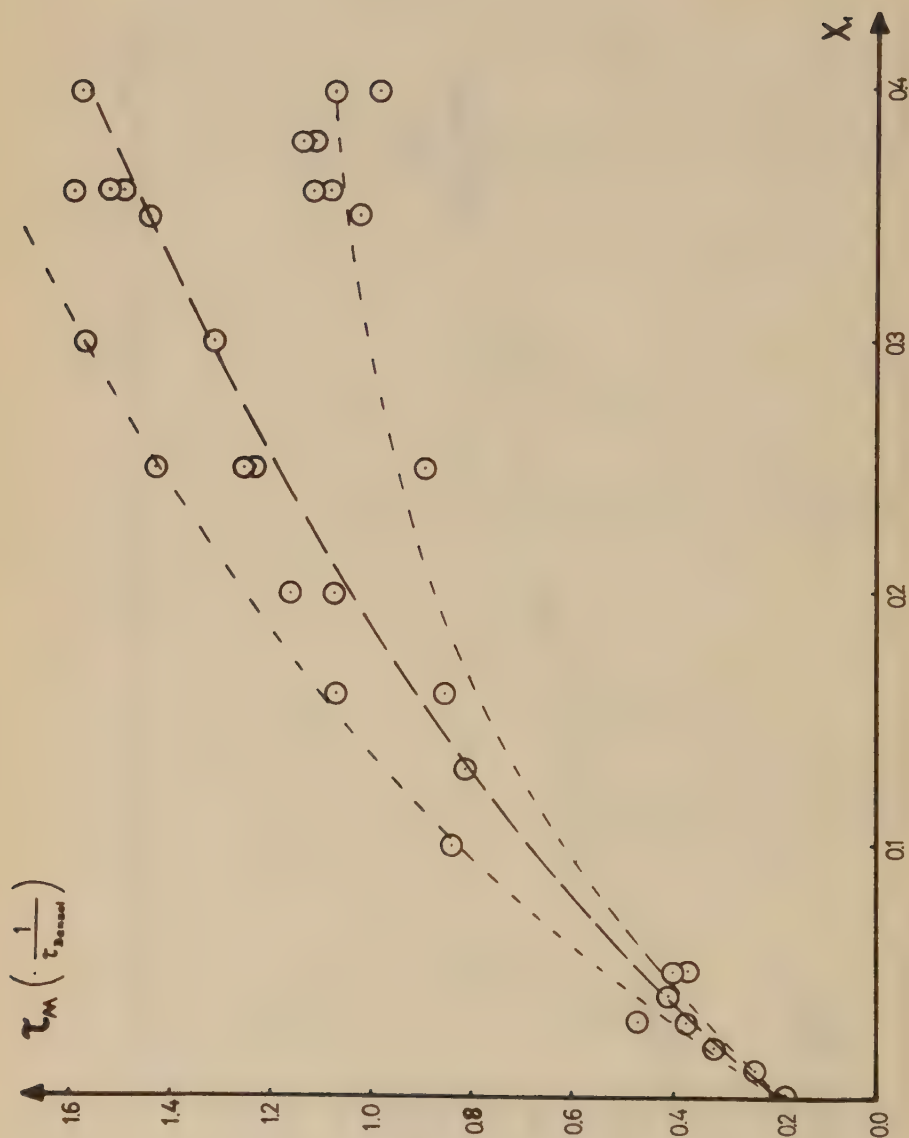


Abbildung 11

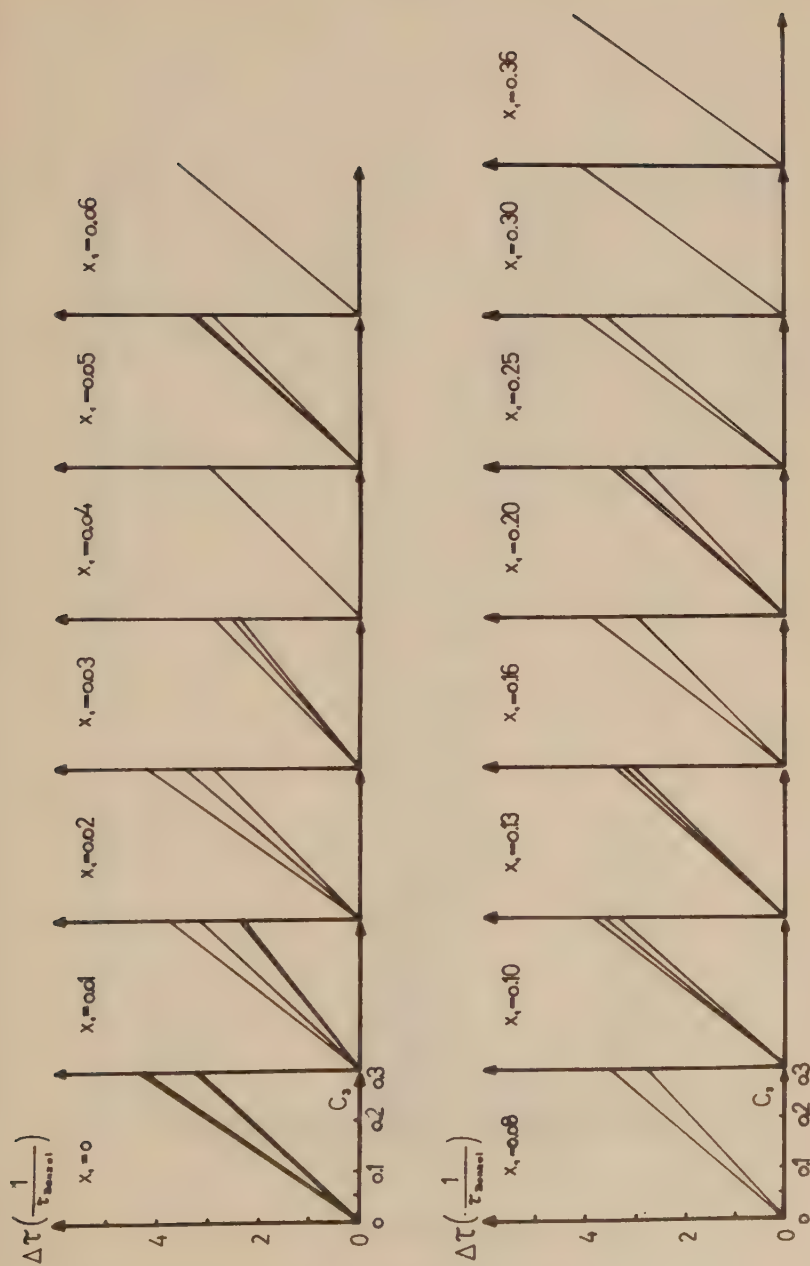


Abbildung 12

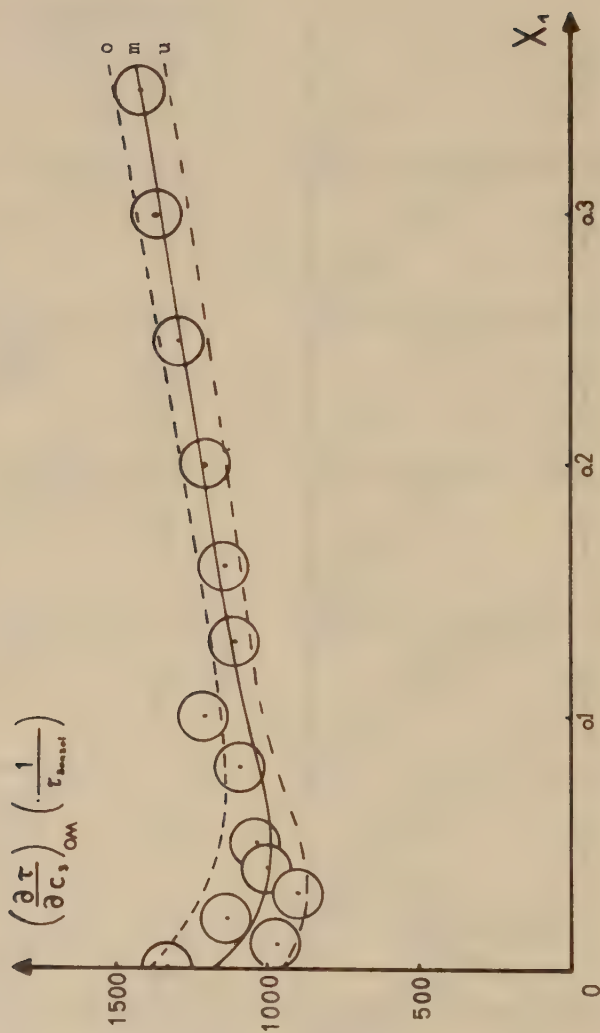


Abbildung 13

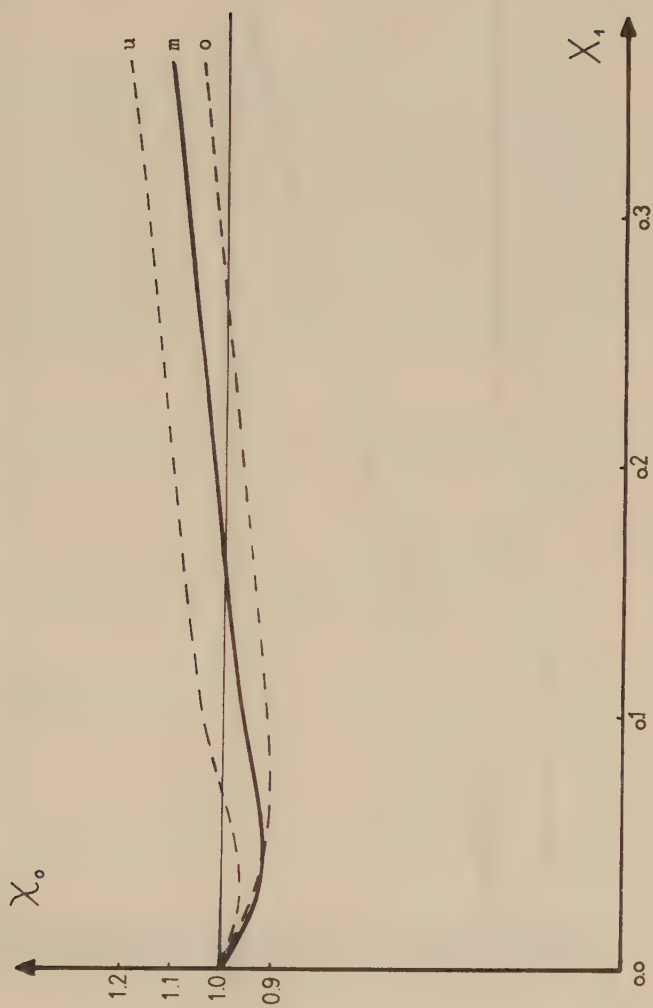


Abbildung 14

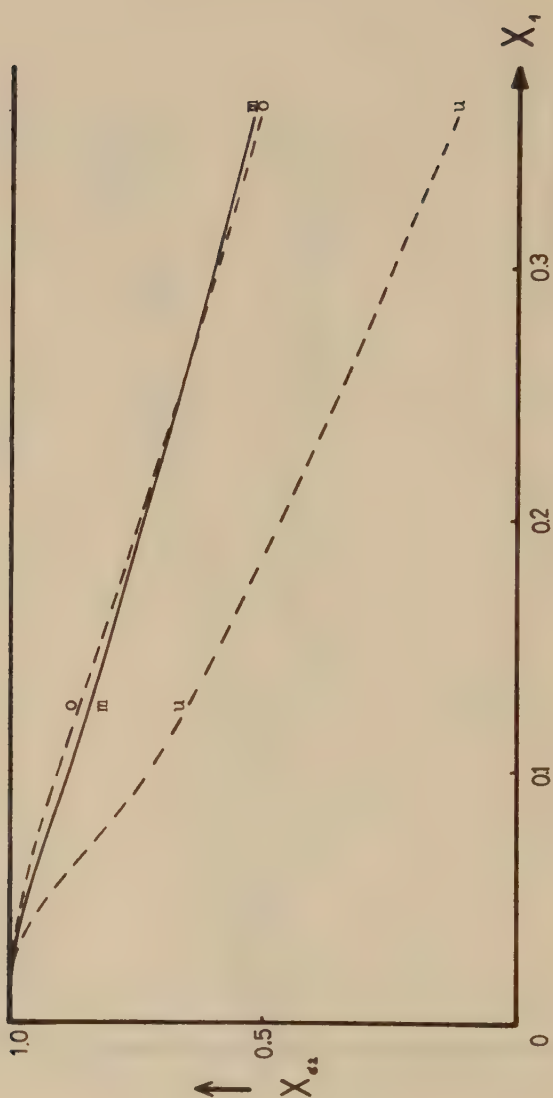


Abbildung 15

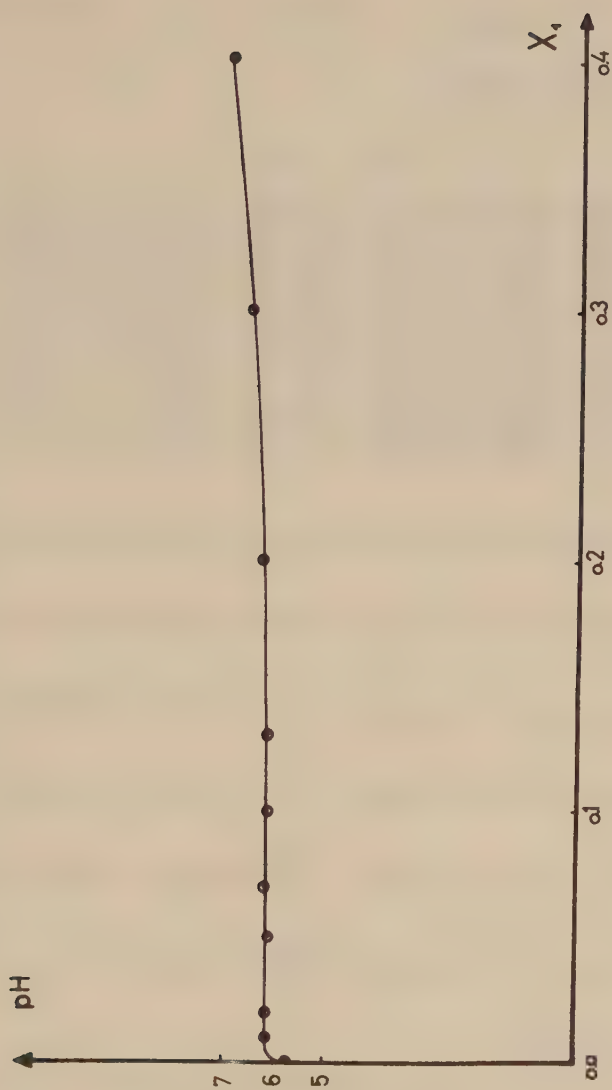


Abbildung 16

x_1	$\Delta T \left(\frac{1}{T_{\text{Benzol}}} \right)$	$\left(\frac{\partial T}{\partial c_3} \right)_{OM} \left(\frac{1}{T_B} \right)$			$\left(\frac{\Delta T}{c_3} \right)_{OM} / \left(\frac{\Delta T}{c_3} \right)_{OW}$					
gemessen ¹⁾	korrigiert									
	m ²⁾	u ³⁾	o ⁴⁾	m	u	o	m	u	o	
0.00	3.98	3.50	2.82	4.17	1167	940	1390	1.000	1.000	1.000
0.01	2.90	3.27	2.72	3.94	1090	907	1313	0.934	0.965	0.945
0.02	3.40	3.10	2.64	3.77	1033	880	1257	0.885	0.936	0.904
0.03	2.70	3.00	2.60	3.63	1000	867	1210	0.857	0.922	0.870
0.04	3.00	2.93	2.63	3.54	977	877	1180	0.837	0.933	0.849
0.05	3.10	2.94	2.68	3.47	980	893	1157	0.840	0.950	0.832
0.06		2.98	2.74	3.42	993	913	1140	0.851	0.971	0.820
0.07		3.03	2.82	3.40	1010	940	1133	0.865	1.000	0.815
0.08	3.28	3.09	2.90	3.41	1030	967	1137	0.883	1.029	0.818
0.09		3.16	2.98	3.43	1053	993	1143	0.902	1.057	0.822
0.10	3.61	3.23	3.04	3.45	1077	1013	1150	0.923	1.078	0.827
0.11		3.29	3.09	3.48	1097	1030	1159	0.940	1.096	0.834
0.12		3.32	3.13	3.52	1107	1043	1173	0.949	1.110	0.844
0.13	3.31									
0.14										
0.15										
0.16	3.43	3.48	3.27	3.68	1160	1090	1227	0.994	1.160	0.883
0.17										
0.18										
0.19										
0.20	3.62	3.64	3.41	3.85	1213	1137	1283	1.039	1.210	0.923
0.21										
0.22										
0.23										
0.24		3.81	3.55	4.02	1270	1183	1340	1.088	1.259	0.964
0.25	3.87									
0.26										
0.27										
0.28		3.97	3.70	4.20	1323	1233	1400	1.134	1.312	1.007
0.29										
0.30	4.13									
0.31										
0.32		4.13	3.85	4.38	1377	1283	1460	1.180	1.365	1.050
0.33										
0.34										
0.35										
0.36	4.25	4.29	4.00	4.56	1430	1333	1520	1.225	1.418	1.093

-
- 1) Mittelwerte
 - 2) Werte auf der wahrscheinlichsten (=mittleren) ΔT -Kurve
 - 3) kleinstmögliche Werte (=untere ΔT -Kurve)
 - 4) größtmögliche Werte (=obere ΔT -Kurve)

Tabelle 1a

x_1	χ_o			n		$(\frac{\partial n}{\partial x_1})_{OM}$	$\frac{n_{OM}}{n_{OM}}$	$(\frac{\partial n}{\partial c_3})_{OM}$
	m	u	o	gemessen	korr.			
0.00	1.000	1.000	1.000	1.34086	1.34086	0.1539	1.00000	0.1795
0.01	0.966	0.982	0.972	1.34251	1.34244	1544	0.99882	1773
0.02	0.941	0.967	0.951	1.34404	1.34403	1547	99764	1756
0.03	0.926	0.960	0.933	1.34566	1.34561	1552	99647	1738
0.04	0.915	0.966	0.921	1.34696	1.34719	1556	99530	1721
0.05	0.917	0.975	0.912	1.34858	1.34877	1560	99413	1704
0.06	0.923	0.985	0.906	1.35017	1.35036	1565	99296	1687
0.07	0.930	1.000	0.903	1.35204	1.35194	1569	99180	1672
0.08	0.940	1.014	0.904		1.35353	1574	99066	1657
0.09	0.950	1.028	0.907		1.35511	1577	98948	1643
0.10	0.961	1.038	0.909	1.35645	1.35670	1583	98833	1629
0.11	0.970	1.046	0.913		1.35828	1588	98717	1616
0.12	0.974	1.053	0.919		1.35986	1592	98603	1602
0.13				1.36119				
0.14								
0.15								
0.16	0.997	1.077	0.940	1.36592	1.36619	1611	98145	1553
0.17								
0.18								
0.19								
0.20	1.019	1.100	0.961	1.37253	1.37253	1631	97692	1509
0.21								
0.22								
0.23								
0.24	1.043	1.121	0.982		1.37920	1652	97220	1469
0.25								
0.26								
0.27								
0.28	1.065	1.146	1.003		1.38586	1673	96753	1430
0.29				1.38903				
0.30								
0.31								
0.32	1.086	1.168	1.025		1.39254	1694	96289	1394
0.33								
0.34				1.39764				
0.35				1.39929	1.39929	1715	95824	1360
0.36	1.107	1.191	1.045					

Tabelle 1b

$x_1 \cdot \frac{n_{OW}}{n_{OM}} \cdot \left(\frac{\partial n}{\partial c_3}\right)_{OM} \quad \chi_o \cdot \frac{n_{OW}}{n_{OM}} \cdot \left(-\frac{\partial n}{\partial c_3}\right)_{OW} \quad \chi_o \cdot \frac{n_{OW}}{n_{OM}} \cdot \left(\frac{\partial n}{\partial c_3}\right)_{OW} - \left(\frac{\partial n}{\partial c_3}\right)_{OM}$							
		m	u	o	m	u	o
0.00	0.1795	0.1795	0.1795	0.1795	0.0000	0.0000	0.0000
0.01	1793	1732	1761	1743	-0.0041	-0.0012	-0.0030
0.02	1791	1685	1732	1703	-0.0071	-0.0024	-0.0053
0.03	1789	1657	1717	1669	-0.0081	-0.0021	-0.0069
0.04	1787	1635	1726	1646	-0.0086	+0.0005	-0.0075
0.05	1784	1636	1739	1627	-0.0068	+0.0035	-0.0077
0.06	1782	1645	1755	1614	-0.0042	+0.0068	-0.0073
0.07	1780	1655	1780	1607	-0.0017	+0.0108	-0.0065
0.08	1778	1671	1803	1607	+0.0014	+0.0146	-0.0050
0.09	1776	1687	1826	1610	+0.0044	+0.0183	-0.0033
0.10	1774	1705	1841	1613	+0.0076	+0.0212	-0.0016
0.11	1772	1719	1854	1618	+0.0103	+0.0238	+0.0002
0.12	1770	1724	1864	1627	+0.0122	+0.0262	+0.0025
0.13							
0.14							
0.15							
0.16	1762	1757	1898	1656	+0.0204	+0.0345	+0.0103
0.17							
0.18							
0.19							
0.20	1754	1787	1929	1686	+0.0278	+0.0420	+0.0177
0.21							
0.22							
0.23							
0.24	1745	1820	1956	1714	+0.0351	+0.0487	+0.0245
0.25							
0.26							
0.27							
0.28	1737	1850	1991	1742	+0.0420	+0.0561	+0.0312
0.29							
0.30							
0.31							
0.32	1728	1877	2018	1771	+0.0483	+0.0624	+0.0377
0.33							
0.34							
0.35							
0.36	1720	1904	2049	1797	+0.0544	+0.0689	+0.0437

Tabelle 1c

x_1	$-\alpha$			$\lim_{x_1 \rightarrow 0} \frac{-\alpha}{\left(\frac{d}{d x_1}(-\alpha)\right)}$		
	m	u	o	m	u	o
0.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.01	+0.0266	+0.0077	+0.0194	+0.0100	+0.0100	+0.0100
0.02	+0.0459	+0.0155	+0.0343	+0.0173	+0.0202	+0.0177
0.03	+0.0522	+0.0135	+0.0445	+0.0196	+0.0176	+0.0229
0.04	+0.0553	-0.0032	+0.0482	+0.0208	-0.0042	+0.0248
0.05	+0.0436	-0.0224	+0.0494	+0.0164	-0.0291	+0.0254
0.06	+0.0268	-0.0434	+0.0466	+0.0101	-0.0564	+0.0240
0.07	+0.0108	-0.0688	+0.0414	+0.0041	-0.0894	+0.0213
0.08	-0.0089	-0.0928	+0.0318	-0.0033	-0.1206	+0.0164
0.09	-0.0279	-0.1160	+0.0209	-0.0105	-0.1508	+0.0108
0.10	-0.0480	-0.1339	+0.0101	-0.0180	-0.1741	+0.0052
0.11	-0.0649	-0.1499	-0.0013	-0.0244	-0.1949	-0.0007
0.12	-0.0766	-0.1646	-0.0157	-0.0288	-0.2140	-0.0081
0.13						
0.14						
0.15						
0.16	-0.1266	-0.2141	-0.0639	-0.0476	-0.2783	-0.0329
0.17						
0.18						
0.19						
0.20	-0.1704	-0.2575	-0.1085	-0.0641	-0.3348	-0.0559
0.21						
0.22						
0.23						
0.24	-0.2125	-0.2948	-0.1483	-0.0799	-0.3832	-0.0764
0.25						
0.26						
0.27						
0.28	-0.2510	-0.3353	-0.1865	-0.0944	-0.4359	-0.0960
0.29						
0.30						
0.31						
0.32	-0.2851	-0.3683	-0.2225	-0.1072	-0.4788	-0.1146
0.33						
0.34						
0.35						
0.36	-0.3172	-0.4017	-0.2548	-0.1193	-0.5222	-0.1312

Tabelle 1d

x_1	x_2	$x_{\oplus 2}$			$x_{\oplus 1}$		
		m	u	o	m	u	o
0.00	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000
0.01	0.990	1.000	1.000	1.000	000	000	000
0.02	0.980	0.997	1.000	0.998	003	000	002
0.03	0.970	0.990	0.988	0.993	010	012	007
0.04	0.960	0.981	0.956	0.985	019	044	015
0.05	0.950	0.966	0.921	0.975	034	079	025
0.06	0.940	0.950	0.884	0.964	050	116	036
0.07	0.930	0.934	0.841	0.951	066	159	049
0.08	0.920	0.917	0.799	0.936	083	201	064
0.09	0.910	0.900	0.759	0.921	100	241	079
0.10	0.900	0.882	0.726	0.905	118	274	095
0.11	0.890	0.866	0.695	0.889	134	305	111
0.12	0.880	0.851	0.666	0.872	149	334	128
0.13							
0.14							
0.15							
0.16	0.840	0.792	0.562	0.807	208	438	193
0.17							
0.18							
0.19							
0.20	0.800	0.736	0.465	0.744	264	535	256
0.21							
0.22							
0.23							
0.24	0.760	0.680	0.377	0.684	320	623	316
0.25							
0.26							
0.27							
0.28	0.720	0.629	0.284	0.624	371	716	376
0.29							
0.30							
0.31							
0.32	0.680	0.573	0.201	0.565	427	799	435
0.33							
0.34							
0.35							
0.36	0.640	0.521	0.118	0.509	479	882	491

Tabelle 1e

Lebenslauf

Ich wurde am 6. April 1926 in St. Blasien geboren und wohnte dort bis zum Tode meines Vaters. Von 1928 bis 1930 lebte ich in Staufen (Baden), von 1930 bis 1936 in Freiburg im Breisgau, wo ich 1933 in die Volksschule kam, von 1936 bis 1937 in Wertherbruch (Rheinland), von wo ich ab Ostern 1937 das Gymnasium in Bocholt (Westfalen) besuchte, von 1937 bis 1939 in Frankfurt am Main, wo ich in die Adlerflycht-Oberschule ging, und von 1939 bis 1943 in Waldkirch bei Waldshut (Hochrhein), wo ich die Oberschule in Waldshut besuchte.

Es folgten der Einsatz als Flak-Helfer (1943), die Einberufung zum Reichsarbeitsdienst und später zur Luftwaffe (1944) und die Kriegsgefangenschaft (bis 1948).

Von 1948 bis 1949 absolvierte ich einen einjährigen "Reifeprüfungslehrgang für Spätheimkehrer", den ich mit dem Abitur abschloß. Im Wintersemester 1949/50 immatrikulierte ich mich für das Studienfach Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz und setzte mein Studium vom Wintersemester 1950/1951 an in Frankfurt am Main an der Johann Wolfgang Goethe-Universität fort. Wegen des seinerzeit in Mainz und Frankfurt herrschenden Mangels an Labor-Arbeitsplätzen konnte ich das Diplomchemiker-Vorexamen erst im Wintersemester 1953/54 ablegen.

Meine Diplomarbeit mit dem Thema "Diffusions- und Sedimentationsmessungen an Milchsäuredehydrogenase" schloß ich im Wintersemester 1959/60 ab.

Seit dem Jahre 1958 bin ich verheiratet.

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Prof. Dr. J. Stauff am Institut für physikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. J. Stauff danke ich herzlich für seine wertvollen Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die er mir während meiner Arbeit erwiesen hat.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemie bin ich für die gewährte finanzielle Unterstützung zu großem Dank verpflichtet.

